

Der Nachweis von Wachstumsfaktoren im Serum und in der
Follikelflüssigkeit und ihre mögliche Rolle bei der Entstehung der
Ovarialinsuffizienz

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Astrid Heiser, geb. Breske
geboren am 08.04.1972 in Jena

Gutachter

1. **PD Dr. W. Starker, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**
2. **Prof. Dr. U. A. Müller, Klinik für Innere Medizin III der Friedrich-
Schiller-Universität Jena**
3. **Prof. Dr. H. Alexander, Universitätsfrauenklinik Leipzig**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.07.2008

Abkürzungsverzeichnis

ANP	atriales natriuretisches Peptid
BMI	body-mass-index
Bp	Bindungsprotein
c	Konzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
DHEAS	Dehydroepiandrosterdion
E2	Östradiol
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	Immun Linked Immunsorbend-Assay
FF	Follikelflüssigkeit
aFGF	acid fibroblast growth factor
bFGF	basic fibroblast growth factor
FGF-5	fibroblast growth factor 5
FGF-6	fibroblast growth factor 6
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
HGH	human growth hormone
ICSI	Intrazytoplasmatische Spermieninjektion
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP	insulin-like growth factor binding protein
IVF	<i>in vitro</i> -Fertilisation
KL	kit ligand
LH	luteinisierendes Hormon
LDL	low density lipoproteins
N	Anzahl
n	sterile Frauen mit unauffälliger Anamnese
PCO	Frauen mit polyzystisch verändertem Ovar ohne Abweichung der Endokrinologie
PCOS	Frauen mit polyzystisch verändertem Ovar mit abweichender Endokrinologie (Hyperandrogenämie, metabolisches Syndrom)
PDGF-AB	platelet derived growth factor
POMC	Proopiomelanocortin
SHBG	Sexualhormon-Bindungs-Globulin
SVGF	sheep virus growth factor
TGF	transforming growth factor
VVGF	vaccinia virus growth factor

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Zielstellung	3
3	Einleitung	5
3.1	<i>Sterilität</i>	5
3.2	<i>Moderne Reproduktionsmechanismen</i>	13
3.3	<i>Grundlagen der ovariellen Regulation</i>	14
4	Material und Methoden	28
4.1	<i>Probandinnencharakterisierung</i>	28
4.2	<i>Methode zur Eizellgewinnung</i>	29
4.3	<i>Testmethode</i>	30
5	Ergebnisse	34
5.1	<i>Analyse der Wachstumsfaktoren im Serum</i>	34
5.2	<i>Analyse der Wachstumsfaktoren in der Follikelflüssigkeit</i>	35
5.3	<i>Vergleich der Konzentrationen von Serum und Follikelflüssigkeit</i>	38
6	Diskussion	50
6.1	<i>Nachweis der Wachstumsfaktoren PDGF-AB, EGF und bFGF im Serum</i>	50
6.2	<i>Nachweis von EGF in der Follikelflüssigkeit</i>	50
6.3	<i>EGF und seine Wechselwirkung mit den ovariellen Steroiden</i>	53
6.4	<i>Zusammenhang zwischen der EGF-Konzentration im Follikel und Follikelvolumen</i>	55
6.5	<i>Die Rolle des EGF beim PCO/PCOS</i>	55
6.6	<i>Nachweis von bFGF in der Follikelflüssigkeit</i>	57
6.7	<i>FGF in der Follikelflüssigkeit und seine Wechselwirkung mit den ovariellen Steroiden</i>	60

6.8	<i>Die Rolle des bFGF beim PCO/ PCOS</i>	62
6.9	<i>Nachweis von PDGF in der Follikelflüssigkeit</i>	64
6.10	<i>Die Wirkungsweise von PDGF am Ovar</i>	65
6.11	<i>PDGF und seine Rolle beim PCO und PCOS</i>	67
7	Zusammenfassung und Ausblick	68
8	Literaturverzeichnis	71

1 Zusammenfassung

Der ovarielle Zyklus der Frau wird nicht allein durch Hormone moduliert. Verschiedene Studien deuten auch auf eine Beteiligung von Wachstumsfaktoren hin. Dabei wird ebenfalls eine Beteiligung an der Entstehung von Störungen der ovariellen Regulation diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Gehalt der Wachstumsfaktoren EGF, bFGF und PDGF-AB im Serum und in der Follikelflüssigkeit bei 27 Frauen nach erfolgter Behandlung im Rahmen einer *in vitro*-Fertilisation mit Hilfe eines Immunassay-Verfahrens (ELISA) bestimmt. Dabei wurden Gruppen steriler Frauen mit unauffälliger Anamnese (N = 9), mit polyzystisch verändertem Ovar und normaler Endokrinologie (N = 10) und Frauen mit polyzystisch verändertem Ovar und abweichender Endokrinologie (N = 8) verglichen. Zusätzlich wurden mögliche Zusammenhänge zwischen den Wachstumsfaktoren und dem Serum- und Follikelhormonstatus sowie dem BMI und dem Follikelvolumen der Frauen untersucht.

Der Nachweis von Wachstumsfaktoren oberhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Testsystems im Serum gelang im Falle von EGF und PDGF-AB in allen Fällen. bFGF konnte nur in der Hälfte der untersuchten Seren nachgewiesen werden. In der Follikelflüssigkeit wurde EGF und PDGF-AB nur in einigen Fällen, bFGF in fast allen Proben gefunden. Der Vergleich der Konzentrationen der Wachstumsfaktoren der einzelnen Gruppen im Serum ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren der Follikelflüssigkeiten in den einzelnen Gruppen an EGF und bFGF im Falle von Frauen mit PCO und PCOS waren signifikant erhöht.

Aufgrund der geringen Anzahl von PDGF-AB-positiven Proben und keinem erfolgten Nachweis in der Gruppe steriler Frauen mit unauffälliger Anamnese ist ein direkter Vergleich der einzelnen Gruppen nicht möglich. PDGF-AB konnte nur in den Follikelflüssigkeiten der PCO- und PCOS-Gruppen gemessen werden. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Konzentrationen. Weiterhin ergaben sich keine Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen den Wachstumsfaktoren und den Hormonen im Serum bzw. in der Follikelflüssigkeit sowie zwischen den Faktoren und dem BMI und dem Follikelvolumen.

Die Untersuchung der Rolle der Wachstumsfaktoren bleibt eine interessante Fragestellung im Hinblick auf die Entstehung der Ovarialinsuffizienz. Im Ergebnis können Hinweise auf eine Involvierung der untersuchten Wachstumsfaktoren auf Prozesse der Follikelreifung diskutiert werden.

2 Zielstellung

Viele Arbeiten haben sich bereits mit dem Thema der Wachstumsfaktoren im Zusammenhang mit der ovariellen Regulation beschäftigt. Trotzdem ist es bisher nicht gelungen, die Funktion dieser Faktoren für das Ovar eindeutig zu klären. Da sie jedoch als weitere mögliche Ursache für die Entstehung verschiedenster ovarieller Funktionsstörungen, die auf dem Gebiet der Sterilitätsdiagnostik- und therapie klinische Relevanz besitzen, zu sehen sind, ist die Erlangung neuer Erkenntnisse über die Wirkmechanismen dieser Faktoren von Bedeutung. Für die vorliegende Untersuchung wurden die Wachstumsfaktoren PDGF-AB, bFGF und EGF ausgewählt. Bei ihnen wird eine unterschiedlich starke Beteiligung an der ovariellen Regulation diskutiert. Ihre Einflüsse auf das Ovar wurden bisher im Tierversuch oder am Menschen untersucht. Die erzielten Ergebnisse über die Art und Weise ihres Wirkens zeigen jedoch noch ein sehr diffuses Bild.

Hauptziel der hier durchgeführten Untersuchung war der Nachweis der Wachstumsfaktoren EGF, bFGF, PDGF-AB mittels ELISA in der Follikelflüssigkeit und im Serum von Frauen mit PCO, PCOS und normozyklischen Frauen ohne abweichende Endokrinologie. Die einzelnen Gruppen wurden auf Unterschiede in ihrer Konzentration an Wachstumsfaktoren untersucht. Die normozyklischen Frauen ohne Endokrinopathie wurden dabei als Kontrollgruppe gegenüber den Frauen mit pathologisch veränderten Ovarien mit normaler Endokrinologie sowie den Frauen mit polyzystischen Ovarien und Endokrinopathie angesehen. Durch die Aufteilung der Patientinnen in die einzelnen Gruppen ist eine Einordnung der Ergebnisse hinsichtlich der Einflussnahme der Wachstumsfaktoren bei der Entstehung der Ovarialinsuffizienz möglich.

Die Follikelflüssigkeit eignet sich als Medium zur Untersuchung der Wachstumsfaktoren, da ein großer Anteil der Substanzen in der Follikelflüssigkeit entsprechend dem Konzentrationsgefälle zwischen Blut und Follikelflüssigkeit systemischen Ursprungs ist. Andererseits finden sich in der Flüssigkeit lokale Sekretionsprodukte der Theka- und Granulosazellen, so dass man die Follikelflüssigkeit als wesentliches Transsudat der Follikelreifung betrachten kann. Zyklische Schwankungen der Konzentrationen von Substanzen in der Follikelflüssigkeit wurden beobachtet. Als Ursachen werden Veränderungen in der zellulären Sekretionsleistung gesehen. Die Untersuchung der Follikelflüssigkeit ist daher eine geeignete Methode, Erkenntnisse über die sich darin befindenden Substanzen zu sammeln und bietet die Möglichkeit deren Einfluss auf die intraovarielle Regulation zu untersuchen.

Folgende Fragestellungen wurden dazu erarbeitet:

- Gibt es einen Unterschied zwischen den Konzentrationen der Wachstumsfaktoren im Serum und in der Follikelflüssigkeit? Unterscheiden sich die untersuchten Gruppen hinsichtlich ihrer Konzentrationen an Wachstumsfaktoren im Serum und in der Follikelflüssigkeit?
- Welcher Einfluss der Wachstumsfaktoren lässt sich bei der Follikelreifung daraus ableiten und sind Wachstumsfaktoren an der Pathogenese des polyzystischen Ovars beteiligt?
- Gibt es Hinweise auf eine Wechselwirkung oder eine Abhängigkeit zwischen den Wachstumsfaktoren und den Hormonen im Serum, in der Follikelflüssigkeit, dem Follikelvolumen und dem BMI der Probandinnen?

3 Einleitung

3.1 Sterilität

Von einer Sterilität wird gesprochen, wenn nach ein bis zwei Jahren regelmäßigen Geschlechtsverkehrs ohne Anwendung von Kontrazeptiva keine Schwangerschaft eingetreten ist. Eine primäre Sterilität liegt vor, wenn eine Frau bisher noch nie schwanger war. Eine sekundäre Sterilität liegt bei Ausbleiben einer weiteren Schwangerschaft vor (Runnebaum, 1994).

Unter Infertilität versteht man die Unfähigkeit, eine Schwangerschaft bis zur Geburt eines lebensfähigen Kindes auszutragen (Runnebaum, 1994).

3.1.1 Epidemiologie der Sterilität

Weltweit sind ungefähr 60 - 80 Millionen Paare von einem unerfüllten Kinderwunsch betroffen. Während sich die Prävalenzrate in den letzten Jahren kaum veränderte, hat sich die Zahl der Frauen, die ihren unerfüllten Kinderwunsch weiter abklären lassen, nahezu verdoppelt. Beim unerfüllten Kinderwunsch wird nicht wie sonst in der Epidemiologie üblich der Eintritt eines Ereignisses gemessen, sondern das Ausbleiben eines Ereignisses (Runnebaum, 1994).

3.1.2 Ursachen der Sterilität

Die Ursachen der Sterilität unterscheiden sich geographisch qualitativ und quantitativ. Die Fertilität hängt von ethnischen, ernährungsbedingten, geographischen, regionalen und sozioökonomischen Faktoren ab (Runnebaum, 1994).

In einer von der WHO 1982 durchgeführten Studie wurde eine grobe Einteilung der Sterilität in verschiedenen Industrieländern und Entwicklungsländern durchgeführt. Dabei kam man zu dem Ergebnis, dass in den Entwicklungsländern die primäre Sterilität relativ niedrig ist. Demgegenüber findet sich aber bei sterilen Paaren in den Industriestaaten meist eine Verteilung von 2/3 mit primärer gegenüber 1/3 mit sekundärer Sterilität (Runnebaum, 1994)

Laut einer WHO-Statistik aus dem Jahre 1987 teilen sich die Ursachen der ungewollten Kinderlosigkeit wie folgt auf (Hoppe et al., 1996):

Störung bei der Frau	39 %
Störung beim Mann	20 %
Störung bei Mann und Frau	26 %
Ungeklärte Störung	15 %

Aus systematisch didaktischen Gründen ist es notwendig, die Ätiologie der Sterilität nach einzelnen Ursachen zu untergliedern. Die klinische Praxis zeigt, dass häufig nicht ein einzelner Sterilitätsfaktor verantwortlich ist. Das Symptom Sterilität kann eine Summe bzw. Multiplikation von einzelnen Faktoren sein.

Zur Abklärung der Ursache einer Sterilität gehört neben der andrologischen Untersuchung des Mannes und der Abklärung der psychosozialen Situation des Paares die Untersuchung des Tubenfaktors und des endokrinen und zervikalen Faktors. Im nachfolgenden Abschnitt werden die einzelnen Ursachen der Sterilität zusammengefasst.

3.1.2.1 Tubare Ursachen

Die verschlossene Tube stellt für die Frau eine der wesentlichsten Ursachen für die Entstehung einer Sterilität dar. Die Durchgängigkeit des Eileiters kann durch Hystersalpingographie, Chromolaparoskopie, Flüssigkeitssonographie, Tuboskopie und nuklearmedizinisch durch eine Hysterosalpingoszintigraphie abgeklärt werden. Etwa die Hälfte der Frauen mit unerfülltem Kinderwunsch hatte eine Salpingitis. Als häufige Ursache ist dabei die Chlamydieninfektion zu sehen. Während die Prävalenz für Chlamydienantikörper in der Normalbevölkerung bei 1/3 liegt, beträgt der Anteil bei sterilen Frauen mit pathologischem Tubenfaktor 85 %. Man vermutet, dass die asymptomatische Salpingitis möglicherweise als Wegbereiter akuter bakterieller Adnexitiden mit Anaerobiern, Streptokokken und Gonokokken sowie deren chronisch rezidivierenden Folgezuständen dienen (Runnebaum, 1994). Das Risiko einer tubaren Sterilität wird nach einer Salpingitis mit 17,4 % angegeben. Eine Genitaltuberkulose führt fast immer zum Tubenverschluss. Als seltene Ursache ist in Endemiegebieten die Schistosomiasis beschrieben worden. Laut WHO hat die Prävalenz an sexuell übertragbaren Erkrankungen in den letzten Jahren stark zugenommen (Runnebaum, 1994). Eine vorausgegangene perforierte Appendizitis sowie das Tragen eines Intrauterinpessars kann bei der Entstehung eines pathologischen Tubenfaktors eine Rolle spielen. Zu den nichtinfektiösen Ursachen eines pathologischen Tubenfaktors zählt die Endometriose in ihrem fortgeschrittenen Stadium. Verursacht wird hier die Sterilität durch Adhäsionen und narbige Veränderungen an der Tubenwand. Als weitere mögliche Genese eines Tubenverschlusses sind Eingriffe im kleinen Becken, besonders Operationen im Bereich der Adnexe, zu nennen. Ein relatives Konzeptionshindernis stellen Tubenpolypen dar. Schließlich ist noch die Gruppe der Frauen mit Zustand nach

Tubensterilität zu erwähnen, die durch eine Änderung ihrer Lebenssituation eine Refertilisierung wünschen. Als Therapie kommt bei intaktem Schleimhautrelief eine mikrochirurgische Sanierung in Frage. Bei isthmischem Verschluss beider Tuben durch Schleimhauthypertrophien und bei polypösen Veränderungen kann eine drei- bis sechsmonatige Behandlung mit Gestagenen (z.B. 5 – 10 mg Norethisteronacetat) oder GnRH-Analoga versucht werden. Des Weiteren kann eine Dilatation mit Hilfe der Tuboskopie erfolgreich sein. Bei persistierendem Verschluss bleibt die Möglichkeit einer mikrochirurgischen Rekonstruktion. Bringen die bisher genannten Therapien nicht das gewünschte Resultat oder wird ein operativer Eingriff seitens der Patientin abgelehnt, ergibt sich als alternative Behandlungsmethode die *in vitro*-Fertilisation (Hoppe et al., 1996).

3.1.2.2 Endokrine Ursachen

Die endokrinologischen Sterilitätsursachen bilden den Hauptanteil der Fertilitätsstörungen der Frau. Die einzelnen hormonellen Faktoren gehen zahlreiche Wechselwirkungen miteinander ein. Eine genaue Zuordnung zum Ort der Störung in der hypothalamisch-hypophysär-ovariellen Achse ist wegen der therapeutischen Konsequenz unerlässlich. Dies gelingt meist durch die Bestimmung der Basishormone und durch geeignete Stimulationstests.

Die Ovarialinsuffizienz lässt sich nach der WHO-Klassifikation von 1976 wie folgt unterteilen:

Gruppe I

- Hypogonadotrope normoprolaktinämische Ovarialinsuffizienz

Gruppe II

- Normogonadotrope normoprolaktinämische Ovarialinsuffizienz

Gruppe III

- Hypergonadotrope Ovarialinsuffizienz

Gruppe IV

- Anatomisch bedingte Amenorrhö

Gruppe V und VI

- Hyperprolaktinämie

Gruppe VII

- Intrakranielle Raumforderungen im Bereich Hypophyse und Hypothalamus
-

3.1.2.2.1 Gruppe I: Hypogonadotrope normoprolaktinämische Ovarialinsuffizienz

Gekennzeichnet ist die hypothalamische Ovarialinsuffizienz durch eine reduzierte Aktivität des hypothalamischen Pulsgenerators, was zu einer fehlerhaften Gonadotropinsekretion führt (Felberbaum & Ortmann, 1998). Im Blut finden sich aufgrund der mangelhaften, fehlenden oder desynchronisierten hypothalamischen GnRH-Freisetzung erniedrigte Konzentrationen an FSH und LH. Die daraus resultierende Funktionsruhe des Ovars findet ihren Ausdruck in erniedrigten Östrogenspiegeln im Blut. Folglich bleibt die Proliferation des Endometriums aus und eine Entzugsblutung kann auch durch die exogene Zufuhr von Gestagenen nicht ausgelöst werden (Keck et al., 2002). Eine hypothalamisch-hypophysäre Ovarialinsuffizienz äußert sich in verschiedenen Störungen, wie in einem anovulatorischen Zyklus, einer Oligomenorrhö, einer Corpus-luteum-Insuffizienz sowie einer Amenorrhö (Felberbaum & Ortmann, 1998). Zu den Ursachen einer hypothalamischen Ovarialinsuffizienz gehört unter anderem das Kallmann-Syndrom als Beispiel für eine Pubertas tarda und die chronifizierte Anorexia nervosa (Keck et al., 2002).

Eine hypophysäre Störung ist eher selten und kann isoliert durch Tumore, Operationen oder Traumen entstehen, ein Beispiel dafür ist das Sheehan-Syndrom. Eine Einteilung des jeweiligen Schweregrads gelingt durch Testverfahren (Gestagentest, Clomiphentest, GnRH-Test). Die Therapie richtet sich nach der Schwere der vorliegenden Störung und sie besteht aus der Verabreichung von Clomiphen, pulsativer GnRH-Applikation oder von Gonadotropinen (Runnebaum, 1994).

3.1.2.2.2 Gruppe II: Normogonadotrope normoprolaktinämische Ovarialinsuffizienz

Gemeinsames Merkmal der darunter zusammengefassten Ovarialinsuffizienzen ist die endogene Östrogenproduktion (Keck et al., 2002).

Gruppe II a

Corpus-luteum-Insuffizienz

Von einer Corpus-luteum-Insuffizienz spricht man, wenn die Lutealphase auf 8 oder weniger Tage verkürzt ist. Die zu kurze bzw. unzureichende Wirkung des Progesterons hat eine unvollständige Umbildung des Endometriums zur Folge und zeigt das Bild einer dysfunktionellen Blutung (Keck et al., 2002).

Anovulatorischer Zyklus

Hier kommt es zur Follikelreifung mit entsprechender Estradiolsekretion, die Ovulation bleibt jedoch aus. Es kommt zu einer Luteinisierung des dominanten Follikels der durch vorzeitige Regression zu Grunde geht und die Eizelle nicht freigibt (Keck et al., 2002).

Gruppe IIb

Hierunter sind Patientinnen mit dem klinischen Bild der primären oder sekundären Amenorrhö bei normalen peripheren Gonadotropinspiegeln zusammengefasst. Durch die Gonadotropine kommt es zu einer ovariellen Östrogenproduktion, die das Endometrium soweit stimulieren kann, dass es unter Zufuhr von exogenen Gestagenen zu einer Entzugsblutung kommt. Diese Form der ovariellen Dysfunktion kann während einer in der Adoleszenz drastisch durchgeführten Gewichtsreduktion beobachtet werden (Keck et al., 2002).

Hyperandrogenämie und das polyzystische Ovarial-(PCOS)-Syndrom

Die Hyperandrogenämie ist durch erhöhte Plasmaspiegel von Androgenen gekennzeichnet. Der Hintergrund einer chronischen Hyperandrogenämie kann das PCOS sein (Runnebaum, 1994).

Bereits 90 Jahre bevor Stein und Leventhal 1935 ihre Arbeit über das nach ihnen benannte PCOS veröffentlichten, beschrieb Chereau erstmals zystische Veränderungen im Ovar. Erhöhte LH-Spiegel wurden 1958 nachgewiesen. Der Radioimmunassay als verlässliche Untersuchungsmethode für eine biochemisch gestützte Diagnostik wurde 1971 vorgestellt. Auch PCOS mit normalen LH-Spiegeln wurden vermutet. Weitere Arbeiten von Khan (Khan, 2001) und Burghen (Burghen et al., 1980) ergaben einen Zusammenhang zwischen Insulinresistenz und PCOS. Swanson gelang es 1981 die Veränderungen am Ovar bei PCOS mittels Ultraschall darzustellen (Swanson et al., 1981). Aber erst als Adams (Adams et al., 1985) die diagnostischen Kriterien für das PCOS formulierte, wurde die Ultraschalluntersuchung eine anerkannte zusätzliche Methode für die Diagnostik des PCO. Heute führt eine kombinierte Beurteilung der Vaginosonographie des Ovars mit den endokrinologischen Befunden zur Diagnosefindung, da ähnlich veränderte Ovarien auch bei normozyklischen Frauen vorkommen können (Runnebaum, 1994). Da das Krankheitsbild sehr heterogen ist, schwanken die Inzidenzzahlen zwischen 0,6 % und 92 % (Runnebaum, 1994). Das morphologische Bild kann sich durch eine Vergrößerung um das eineinhalbe bis

zweifache der Ovarien auszeichnen (Geyter, 1994), wobei auch normal große Ovarien möglich sind (Homburg, 1996). Die Ovarien zeigen häufig keine Ovulationsstigmata und können von einer derben Bindegewebsschicht umgeben sein. Durch diese Schicht schimmert eine Vielzahl subkortikaler Follikelzysten. Im histologischen Bild zeigt sich eine Vielzahl atretischer Follikelzysten, die von einem hypertrophischen Interstitium umgeben sind (Geyter, 1994). Adams spricht von einem polyzystisch veränderten Ovar, wenn mehr als 10 Follikel mit einem Durchmesser von $< 9\text{mm}$ und die kritische Dicke des Stromas um 25 % vermehrt ist (Adams et al., 1985). Unter dem Begriff des Syndroms des polyzystischen Ovars verbirgt sich ein uneinheitliches Krankheitsbild, welches durch Oligo-Amenorrhö, Infertilität, Hirsutismus, Akne und Seborrhö gekennzeichnet ist. Ein erhöhter LH-FSH-Quotient kann nicht als typisches Diagnosekriterium angesehen werden (Felberbaum & Ortmann, 1998). Eine familiäre Häufung mit zum Teil autosomal-dominantem Erbgang ist zu beobachten (Runnebaum, 1994). Adam fasste 1996 als Krankheitsbild PCOS den typischen Ultraschallbefund des polyzystisch veränderten Ovars in Anwesenheit von Oligo- bzw. Amenorrhö und, oder mit klinischen Symptomen der Hyperandrogenämie zusammen. Im Vergleich zu gesunden Frauen sind die Konzentrationen bei Patientinnen mit PCOS an Testosteron, freiem Testosteron, Androstendion, LH, LH:FH Ratio, freiem Östradiol und kurz wirksamen Insulin erhöht und die Konzentration an SHBG erniedrigt (Conway et al., 1989), (Franks, 1989). Es wurden bei Patientinnen mit PCOS eine erhöhte LH-Pulsamplitude und LH-Frequenz nachgewiesen (Ortmann, 1998). Bei ca. 2 % der Frauen stellt ein 21-Hydroxylase-Mangel die Ursache für ein PCOS dar. (Ortmann, 1998). Ein weiterer Faktor, der zur Entstehung eines PCOS beitragen kann, ist die Hyperinsulinämie. Sie kommt gehäuft, aber nicht ausschließlich, bei übergewichtigen Frauen vor. Über zwei Mechanismen trägt die Hyperinsulinämie zur Entstehung des PCOS bei. Zum einen stimuliert Insulin über Rezeptoren der Theka die ovarielle Androgenproduktion, zum anderen senkt Insulin die Synthese von SHBG in der Leber. Als Folge kommt es zur Steigerung des frei verfügbaren Androgens. Dies führt zur Atresie der heranreifenden Follikel, wobei der Stromaanteil des Ovars zunimmt. Polson (Polson, et al. 1988) untersuchte gesunde normozyklische Frauen mit PCO und fand bei 90 % klinische und biochemische Auffälligkeiten. Die Untersuchung einer weiteren Gruppe von ovulatorischen Frauen mit PCO ergab bei diesen Frauen Probleme mit wiederholten Fehlgeburten (Sagle et al., 1988) und einer verminderten Fertilität (Eden et al., 1989). Conway demonstrierte bei Frauen mit PCO typische klinische

und endokrinologische Befunde, bei denen zuvor die Diagnose nur auf Grund des Ultraschallbefundes gestellt wurde (Conway et al., 1989). Eine Sonderform des PCOS ist die Hyperthekosis, die durch Inseln von Thekazellen im Stroma des Ovars gekennzeichnet ist. Verursacht wird dies durch eine anhaltende Anovulation, wobei sich vom atretischen Follikel Thekazellen entkoppeln und im Stroma des Ovars erhalten bleiben. Dieser Zustand ist durch eine überhöhte Freisetzung von Testosteron gekennzeichnet. Durch die negative Rückkopplung ist im Gegensatz zum PCOS der LH-Spiegel erniedrigt (Geyter, 1994).

Hyperandrogenämie

Je nach ethnischer Abstammung weist etwa 1/4 bis 1/3 aller hyperandrogenämischen Frauen Enzymdefekte im Sinne eines androgenitalen Syndroms auf. Die häufigste Form stellt dabei der 21-Hydroxylase-Mangel dar. Es handelt sich dabei um ein autosomal rezessives Erbleiden. Durch den Enzymdefekt kann es zu einer Nebennierenrindenhyperplasie kommen, welche in schwerer Form mit einem Salzverlustsyndrom kombiniert sein kann. Klinisch äußert sich der Defekt in einer Klitorishypertrophie und einem hochgezogenem Damm mit Bildung eines Sinus urogenitalis. Die Therapie beinhaltet die Substitution der Gluko- und Mineralokortikoide (Keck & Meinert Breckwoldt, 2002). Beim spät einsetzenden adrenogenitalen Syndrom (late onset adrenal Hyperplasia) handelt es sich um eine gering ausgeprägte Form des 21-Hydroxylase-Mangels (Keck et al., 2002).

Eine hypothyreote Stoffwechsellaage kann ebenfalls zu einer Hyperandrogenämie führen. Die Störung ist über eine Erhöhung der Konzentration des thyreotropen stimulierenden Hormons im Serum definiert. Verursacht wird dieses durch eine fehlende negative Rückkopplung der erniedrigten Schilddrüsenhormone Thyroxin bzw. seine biologisch aktiven Metabolite. Die Synthese von SHBG in der Leber wird durch Schilddrüsenhormone stimuliert. Durch die fehlende Stimulation fällt der SHBG-Spiegel ab. Als Folge steigt der Testosteronspiegel an, was zu einer funktionellen Hyperandrogenämie mit den entsprechenden endokrinologischen Auswirkungen auf die Ovarialfunktion führt (Runnebaum, 1994). Auf andere Formen einer Hyperandrogenämie wird hier nicht näher eingegangen.

3.1.2.2.3 Gruppe III: Hypergonadotrope Ovarialinsuffizienz

Die Störung ist durch eine primäre oder sekundäre Amenorrhö bei primärer Ovarialinsuffizienz gekennzeichnet. Die ovarielle Steroidsynthese ist derart gestört, so dass es über eine Entkopplung des Feedbackmechanismus an Hypophyse und

Hypothalamus zu einer Steigerung der Gonadotropinsekretion, wie in der Menopause, kommt. Die häufigsten Ursachen stellen die verschiedenen Formen der Gonadendysgenese, das echte Klimakterium präcox, Autoimmunerkrankungen sowie die Schädigung des Keimepithels durch Zytostatika dar. Besonders bei Frauen unter 35 Jahren mit primärer Ovarialinsuffizienz oder sekundärer Amenorrhö ist eine chromosomale Aberration auszuschließen. Im Vordergrund stehen dabei vor allem die numerischen Aberrationen des X-Chromosoms, beispielsweise das Ullrich-Turner-Syndrom (Felberbaum & Ortmann, 1998). Bei dieser Form von Störungen sind Schwangerschaften nur selten zu erzielen (Runnebaum, 1994).

3.1.2.2.4 Gruppe IV: Anatomisch bedingte Ursachen

Die hierunter zusammengefassten Patientinnen leiden unter einer primären Amenorrhö ohne das Vorliegen einer Ovarialinsuffizienz. Als Beispiel ist hier das Meyer-Rokitanzki-Küster-Syndrom zu nennen.

3.1.2.2.5 Gruppe V und VI: Hyperprolaktinämie

75 % aller Frauen mit Galaktorrhö und 15 % der Frauen mit Zyklusstörungen weisen erhöhte Prolaktinspiegel auf, die die Ovarfunktion beeinträchtigen (Felberbaum & Ortmann, 1998). Die Hyperprolaktinämie führt zu einer Beeinflussung des Zyklusgeschehens auf mehreren Ebenen und hemmt die regelmäßige Follikelreifung und Ovulation. Ursächlich für eine Hyperprolaktinämie können ein Prolaktinom, Stress, eine Schilddrüsenunterfunktion sowie Medikamente mit dopaminergem Wirkungsspektrum sein. Ziel der Therapie ist es, den Prolaktinspiegel zu normalisieren. Das Mittel der Wahl ist eine einschleichende Behandlung mit Dopaminagonisten. Nach Felberbaum liegt die dabei erzielte Schwangerschaftsrate bei 45 %. Bei Tumoren sollte erst bei Versagen der medikamentösen Therapie oder bei Größenzunahme des Tumors neurochirurgisch interveniert werden (Felberbaum & Ortmann, 1998).

3.1.2.2.6 Gruppe VII: Intrakranielle Raumforderungen im Bereich der Hypophyse und Hypothalamus

Hierbei liegen raumfordernde Prozesse in der Hypothalamus-Hypophysen-Region vor, ohne dass es zu einer Beeinträchtigung der Prolaktinfreisetzung kommt. In der Mehrzahl handelt es sich um Kraniopharyngeome und Hämatoeme. Als Therapie kommt nur eine neurochirurgische Intervention in Frage (Keck et al., 2002).

3.1.2.3 *Uterine Ursachen*

Zu den Ursachen einer uterin bedingten Sterilität gehören angeborene Fehlbildungen der Müllergänge. Wobei diese Veränderungen häufiger zu habituellen Aborten führen als zu einer Sterilität der Frauen. Myome sind eher als Ursache für eine Infertilität zu sehen und sollten erst nach Ausschluss anderer Sterilitätsfaktoren als Ursache für den unerfüllten Kinderwunsch angesehen werden. Als Behandlungsmethode steht die Myomektomie zur Verfügung. Als weitere uterine Ursache ist die gestörte Endometriumfunktion zu nennen. Diese tritt als Folge traumatischer oder postinfektiöser Destruktionen des Endometrium auf. Auch im Rahmen einer Lutealinsuffizienz kommt es zu einer verminderten Leistungsfähigkeit des Endometrium (Runnebaum, 1994).

3.1.2.4 *Zervikale Ursachen*

Zu den Ursachen gehören posttraumatische Schädigungen der Zervix und durch Polypen, Tumore, Myome und Zervixstenosen erworbene Störungen (Runnebaum, 1994).

3.1.2.5 *Andrologische Ursachen*

Eine verminderte Spermienqualität kann einen unerfüllten Kinderwunsch zur Folge haben. Hodentumore, Varikozelen, entzündliche Adnexprozesse, Lageanomalien der Testes sowie ein endokriner Hypogonadismus können dafür verantwortlich sein. Zu den selteneren Diagnosen sind die immunologischen Störungen, Zustand nach Trauma, Orchitis (Mumps), sowie Einflüsse durch Allgemeinerkrankungen, wie Diabetes mellitus, oder durch Medikamente zu zählen. Die Mehrzahl der andrologisch verursachten Sterilität wird durch eine idiopathische Störung hervorgerufen. Einen nicht zu unterschätzenden Einfluss kann die Umwelt bei der Genese männlicher Fertilitätsstörungen ausüben. So kann die Wirkung von Alkohol, Nikotin, Schwermetallen und Pestiziden die Zeugungsfähigkeit des Mannes beeinträchtigen (Schreiber, 1996).

3.2 Moderne Reproduktionsmechanismen

Im Jahre 1978 war man erstmals in der Lage, eine Befruchtung außerhalb des menschlichen Körpers und den anschließenden Transfer in den menschlichen Uterus vorzunehmen. Vor jeder Eizellgewinnung ist zurzeit noch eine hormonelle Vorbehandlung notwendig. Zur ovariellen Stimulation stehen dabei unterschiedliche

Stimulationsmethoden zur Verfügung. Der Fertilisationserfolg hängt dabei maßgeblich vom hormonellen Reifegrad der Eizelle ab. Die Eizellgewinnung erfolgt durch ultraschallgestützte Punktion. Routinemäßig werden dabei Estradiol, LH und Progesteron im Blut bestimmt und die Endometriumdicke (korreliert mit dem Estradiolgehalt im Blut) sonographisch ermittelt. Vor der Auslösung der Ovulation mit HCG erfolgt eine Progesteron- und LH-Bestimmung im Blut (Krebs, 1994). Die Oozyten werden extrakorporal fertilisiert und später als Embryonen transvaginal in den Uterus implantiert.

Ovarielle Stimulation durch Clomiphen

- Clomiphenstimulation
 - Stimulation mit Clomiphen und Gonadotropinen
-

Behandlung der anovulatorischen Funktionsstörung mit Gonadotropinen

- Stimulation mit humanen Gonadotropinen: HMG und urinärem FSH
 - Stimulation mit Clomiphen und FSH
-

Therapiemöglichkeiten im Rahmen der assistierten Reproduktion

- Stimulation ohne Vorbehandlung mit GnRH-Analoga
 - Stimulation mit Clomiphen und Kombination mit Gonadotropin und HCG
 - Stimulation mit Gonadotropinen und Ovulationsauslösung durch HCG
 - Stimulation mit Vorbehandlung durch GnRH-Analoga (long-, short- oder ultra-short-Protokoll)
 - Stimulation mit Vorbehandlung durch GnRH-Antagonisten
-

3.3 Grundlagen der ovariellen Regulation

3.3.1 Endokrinologie der Follikulogenese

In der späten Corpus-luteum-Phase erfolgt die bilaterale Rekrutierung einer Kohorte von Primordialfollikeln, von denen ein einzelner Follikel selektioniert wird und bis zur Ovulation heranreift. Die übrigen Follikel gehen unter. Mit dem Wachstum und der weiteren Differenzierung des selektionierten Follikels nimmt die perifollikuläre Vaskularisation zu. Gleichzeitig proliferieren und differenzieren sich die Granulosazellschicht und die Theka interna, deren Hormone in einer zeitlich festgelegten Abfolge aktiv in den hypothalamisch-hypophysären Regelkreis eingreifen. Die Gonadotropine greifen an membranständige Rezeptoren und aktivieren die an der Membraninnenseite gelegene Adenylatzyklase. Diese induziert die Bindung von cAMP. Als Folge der Akkumulation der cAMP kommt es

zum Einstrom extrazellulären Kalziums und zur Ausschüttung intrazellulären Kalziums aus dem endoplasmatischen Retikulum. Dies bewirkt die Aktivierung der Proteinkinase A, worauf die Induktion und Modifikation von Enzymaktivitäten, Vesikelformationen und die Expression von Genen möglich werden. Durch die Aufnahme von LDL aus dem Blut ist die Theka interna in der Lage, Cholesterin zu nutzen und es über Progesteron (C21-Steroide) in Androgene umzuwandeln. Durch das Fehlen des Aromatasesystems in den Theka Zellen stauen sich die Androgene (C19-Steroide) an, die an die Zirkulation oder in die Follikelflüssigkeit zurückgegeben werden oder der Granulosazellschicht zufließen. Bis zur späten Follikelphase ist die avaskularisierte Granulosazellschicht nicht zur eigenständigen Steroidsynthese befähigt. FSH führt zu einer Stimulation der Granulosazellmitoserate und zu einer Induktion der P450-Aromatase, die die thekalen Androgene zu Östrogenen (C18-Steroide) metabolisiert. Die C(18)-Steroide steuern nun autoparakrin mitogene und zelldifferenzierende Effekte bzw. regulieren durch endokrine Mechanismen die hypothalamisch-hypophysäre Achse. Dieser Regulationsmechanismus der Östradiolsynthese wird basierend auf den Publikationen von Falck als Zweizelltheorie bezeichnet (Felberbaum & Ortmann, 1998). In der späten Follikelphase erfolgt die FSH-induzierte Expression der LH-Rezeptoren an der Granulosazelle. Mit der Einsprossung von Gefäßen in die Granulosazellschicht ist nun auch die Granulosazellschicht zur Aufnahme von LDL befähigt und kann somit Progesteron synthetisieren. Durch eine nicht ausreichende 17, -21-Desmolase-Aktivität, welche den enzymatischen Abbau zu Androgenen gewährleistet, reichert sich Progesteron an der Granulosazelle an. Dieses leitet den Teil des postovulatorischen Vorgangs ein, der als Luteinisierungsphase bezeichnet wird. Darunter versteht man die Umwandlung der vorwiegend C18-Steroide produzierenden Granulosazelle in die hauptsächlich C21-Steroide synthetisierende Luteinzelle. Die Ovulation besteht insgesamt aus der Luteinisierung, aus der Vollendung der 2. Reifeteilung, aus der Ablösung des Cumulus oophorus von der Follikelwand und dem Efflux des Oozyten, durch die Ruptur der Follikelwand, an deren Anschluss der Follikel kollabiert. Durch massive Neovaskularisierung entsteht das Corpus luteum, welches eine starke Progesteronsekretion entfaltet. Erfolgte keine Befruchtung, wird das Ende des Zyklus mit der Rückbildung des Corpus luteum eingeleitet (Geisthövel, 1992).

3.3.2 Die Chronologie der Follikulogenese

Die dominanten Follikel stammen von Primordialfollikeln, die ein Jahr zuvor selektiert wurden. Die erste Phase des Follikelwachstums vollzieht sich langsam. Ca. 300 Tage benötigt der Primordialfollikel die präantrale Periode zu vollenden. Ursache für das langsame Wachstum ist die lange Teilungszeit der Granulosazellen (Gougeon, 1986). Die präantrale Entwicklungsphase scheint dabei Gonadotropin-unabhängig zu sein. In der nächsten Entwicklungsphase, in der der Follikel als antraler oder Graafscher Follikel bezeichnet wird, wächst der Follikel hingegen sehr schnell. Hier kommt es auch zur Akkumulation der Follikelflüssigkeit. Der Graafsche Follikel durchläuft in seiner Entwicklung mehrere Stadien, die FSH-Spiegel-abhängig sind. Der dominante Follikel wird aus gesunden Graafschen Follikeln (2 – 5 mm) selektiert (Gougeon, 1986), (Gougeon & Lefevre, 1983). Einmal ausgesucht, benötigt der Follikel 20 Tage, um sich bis zum Ovulationsstadium zum präovulatorischen Follikel zu entwickeln. Während dieser 20 Tage andauernden Periode gehen die nichtdominanten Follikel unter. Es ist anzunehmen, dass während der gesamten Follikulogenese Follikel atretisch werden, jedoch die höchste Untergangsrate in der Selektionsphase zu finden ist.

3.3.3 Die Physiologie der Selektion

Der dominante Follikel, dessen Zelle im nächsten Zyklus ovuliert, wird am Ende der Lutealphase des Menstruationszyklus ausgewählt (Chikazawa et al., 1986), (Gougeon & Lefevre, 1983), (Gougeon, 1986). Zu diesem Zeitpunkt beinhaltet das Ovar eine Kohorte von 5 - 8 Follikeln mit einem Durchmesser von 4,7 mm (McNatty, 1981), (Gougeon & Lefevre, 1983), (Gougeon, 1986). Jeder dieser Follikel enthält 50 µl Follikelflüssigkeit, zu der etwa 1 Mio. Granulosazellen und die Theka interna mit differenzierten Theka interna-Zellen und eine Schicht mit glatten Muskelzellen gehören. Die Selektion beinhaltet ein starkes Ansteigen der Mitoserate der Granulosazellen, wobei der selektierte Follikel das stärkste Wachstum erfährt. Die anderen Follikel wachsen langsam bis es zum Stop der Mitose kommt und die Follikel der Apoptose unterliegen. Der physiologische Anstieg des FSH ist für die Selektion notwendig, wobei ein individuell unterschiedlicher Schwellenwert für FSH besteht (Felberbaum & Ortmann, 1998). Das Ansteigen des FSH-Spiegels beginnt einige Tage bevor der Progesteronspiegel den Basallevel am Ende der Lutealphase erreicht und hält bis in die erste Woche der Follikelentwicklung an (Roseff et al., 1989). Dass FSH für das Überleben eines Follikels von Bedeutung ist, wird durch die Beobachtung

gestützt, dass der FSH-Spiegel in atretischen Follikeln niedriger als in den dominanten Follikeln ist (Erickson, 1996). In der Follikelflüssigkeit von gesunden Graafschen Follikeln steigt die FSH-Konzentration an, während in der Follikelflüssigkeit von atretischen Follikeln nur sehr wenig bis gar kein FSH gefunden wurde (Erickson, 1996). Ein Effekt des FSH ist der zeitabhängige Anstieg des Östradiolspiegels während der Follikelphase durch Anstieg der Granulosamitoserate. Dieser Anstieg führt zu einem negativen Feedback hinsichtlich der FSH-Ausschüttung der Hypophyse. Der Abfall der FSH-Konzentration scheint eine Rolle bei der Atresie der nichtdominanten Follikel zu spielen. Eine Behandlung mit Gonadotropin in der frühen Follikelphase führt auch bei nichtdominanten Follikeln zu einer Erhöhung der Mitoserate der Granulosazellen. Vergleicht man einen gesunden dominanten Graafschen Follikel mit einem atretischen nichtdominanten Follikel, so findet man im dominanten Follikel relativ hohe Werte an FSH. Niedrige Dosen von FSH führen zum Rückgang der Granulosazellmitoserate und zu einer begrenzten Menge an Östradiol. Das Verhältnis von Androstendion/Östradiol im atretischen Follikel erlangt Werte größer 1 (Erickson, 1996).

3.3.4 Die intraovarielle Regulation

Die Zyklizität der Ovarialfunktion ist eine komplexe Kaskade hormoneller und nichthormoneller Aktionen. Im Mittelpunkt steht dabei immer noch der Gonadotropin-Steroid-Regelkreis. Neue Erkenntnisse über nicht Gonadotropin-ähnliche nichtsteroidale Faktoren lassen jedoch die ovarielle Entwicklung des Follikels als ein kompliziertes Zusammenwirken verschiedenster Regulationselemente erscheinen.

Da bestimmte Abschnitte in der Entwicklung des Follikels Gonadotropin-unabhängig verlaufen und Störungen in der Follikulogenese trotz normaler Hormonwerte auftreten können, kommt der Untersuchung der Zytokine eine immer größer werdende Bedeutung zu. Zum Verständnis der intraovariellen Regulation ist eine allgemeine Vorstellung über zelluläre und subzelluläre Interaktionen der beteiligten Faktoren unabdinglich. Es ist bekannt, dass Substanzen von ihrer Genexpression bis zu den von ihnen induzierten Effekten divergierende aber auch kongruierende Beziehungen eingehen (Geisthövel, 1992). In Tab. 1 erfolgt eine Aufzählung der Faktoren, die an der intraovariellen Regulation beteiligt sind. Die Aufstellung der Faktoren orientiert sich dabei an der Zugehörigkeit zu Stoffklassen

und Funktionssystemen. Die einzelnen zu steuernden Parameter im Follikel sind in Tab. 2 dargestellt.

Tabelle1: An der intraovariellen Regulation beteiligte nicht steroidale , nicht gonadotrope Faktoren (Geisthövel, 1992).

<ul style="list-style-type: none"> • Insulin, IGF-1, IGF-2, IGFBP (Yap et al, 1998), Relaxin • EGF, TGF alpha, βeta • ANP • bFGF, aFGF • VEGF • PDGF • Transforming growth factor-β • Inhibin • Aktivin • Follistatin • GnSIF • Prolaktin • Gn-RH, Gn-RH-ähnliches Peptid, Oxytocin, Vasopressin, Melatonin, POMC • Glukokortikoide • Eicasanoide • Transferrin • Lipoproteine, Apolipoproteine E • Prorenin, Renin, Angiotensin, Plasminogenaktivator, Plasmin, Metalloproteinase • Interleukine, TMF, Makrophagen, T-Lymphozyten • Proteoglyane, Fibronektin
--

Tabelle 2: Basale Funktionen der Theka / Granulosazellschicht (Geisthövel, 1992)

• Thekazelle:	Replikation
	LH-Rezeptor-Expression
	cAMP-Akkumulation
	C19-Steroid-Sekretion
• Granulosazelle:	Replikation
	FSH-Rezeptor-Expression
	cAMP-Akkumulation
	Aromataseaktivierung
	C18-Steroid-Synthese
	LH-Rezeptor-Expression
	C21-Steroid-Sekretion

3.3.5 Biochemische Eigenschaften und Physiologie der Wachstumsfaktoren EGF, bFGF und PDGF- AB

Die untersuchten Wachstumsfaktoren gilt es an dieser Stelle hinsichtlich ihrer Struktur und ihrer biochemischen Eigenschaften zu charakterisieren. Dabei wird auf eine Zusammenfassung der bisher erlangten Erkenntnisse bzw. Vermutungen über das Wirken der ausgewählten Wachstumsfaktoren eingegangen.

3.3.5.1 Biochemische Charakterisierung des EGF

Tabelle 3: Mitglieder der EGF-Familie (Normanno et al., 1994).

• EGF
• TGF-alpha
• Heparin-binding-EGF (HB-EGF)
• Amphiregulin
• cripto-1
• betacellulin
• heregulin-alpha
• virus-derived growth factors

EGF ist ein einkettiges Polypeptid, bestehend aus 53 Aminosäuren. 3 Disulfidbrücken definieren 3 Loopregionen von Rest 1 - 20, 14 - 31 und 32 - 53 (McDonald et al., 1989). Untersuchungen von menschlichem und tierischem EGF mittels zweidimensionaler nuklearer Magnetresonanztchnik (NMR) ließen die

Annahme einer kugelförmigen Gesamtstruktur in Lösung zu (Cooke et al., 1987), (Montelione et al., 1987). Dabei ist die Tertiärstruktur in zwei Domänen organisiert. EGF wird von unterschiedlichen Genen kodiert. Analysen der Sequenzvariationen des EGF von verschiedenen Spezies im Vergleich mit verwandten Wachstumsfaktoren wie alpha-TGF und VVGF zeigen eine 20 %ige Homologie. Nur wenige Reste sind vollständig konserviert. Die verschiedenen konservierten Reste liegen räumlich dicht beieinander. All diese verwandten Proteine haben die gleiche biologische Aktivität und binden mit einer hohen Affinität an den EGF-Rezeptor (Giordano et al., 1992). Verschiedene Arbeiten über humanes EGF haben unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Rolle und Flexibilität des C-Terminus gezeigt. Eine äquivalente Kürzung der Reste 1 - 48 des humanen EGF haben zu einer Reduzierung der Bindungsaktivität geführt, jedoch blieb die mitogene Aktivität erhalten. Es lässt sich also vermuten, dass diese Region für die Rezeptorbindung verantwortlich ist (Makino et al., 1987), (Hollenberg & Gregory, 1980), (Gregory et al., 1988). EGF-ähnliche Domänen wurden in verschiedenen anderen Proteinen gefunden, so in TGF-alpha, VVGF, SVGF, im Gewebsplasminogenaktivator Protein C, im Gerinnungsfaktor XII und IX sowie im LDH-Rezeptor. Viele dieser ähnlichen Moleküle sind in der Oberflächeninteraktion analog zum EGF aktiv dabei, jedoch mit unterschiedlicher Spezifität. EGF interagiert mit seinem Rezeptor über extensive Oberflächenregionen, die nur durch die charakteristische tertiäre Faltung des Proteins entstehen (McDonald et al., 1989). Der die gesamte Membran durchspannende Rezeptor bindet EGF an seinem glykosylierten extrazellulären Teil und aktiviert dadurch den intrazellulären Teil, eine Tyrosin-Kinase. Die aktivierte Enzymdomäne überträgt eine Phosphatgruppe auf bestimmte Tyrosin-Seitenketten des Rezeptors selbst und auf andere zelluläre Proteine und löst damit eine Signalkette nach dem Prinzip des second messenger aus. Die Struktur des EGF-Rezeptors kann man in eine extern Liganden bindende Domäne und in eine interne Domäne mit Tyrosin-Kinase-Aktivität unterteilen. Der EGFR gehört zusammen mit den Protooncogenen zur Rezeptorenklasse I (McDonald et al., 1989).

3.3.5.2 *Biochemische Charakterisierung des bFGF*

Die Bezeichnung FGF wurde erstmals im Jahre 1974 von Gospodarowicz (Gospodarowicz, 1974) gebraucht, um ein kationisches Polypeptid mit einem pH-Wert von 9,6 zu beschreiben, das in der Hypophyse nachgewiesen wurde und die Zellteilung von 3T3-Zellen stimuliert. Weiterhin wurde im Gehirn ein anionisches

Polypeptid bei einem pH-Wert von 5,6 isoliert, das die Funktion eines potenten Mitogens für Endothelzellen erfüllt. Die Bezeichnungen aFGF und bFGF leiten sich aus den Namen dieser zwei Polypeptide ab (Klagsbrun, 1989).

Der fibroblast growth factor bildet zusammen mit sechs weiteren strukturell verwandten Polypeptiden eine Familie. Die bestcharakterisierten Mitglieder dieser Familie sind aFGF (a für „acidic“) und bFGF (b für „basic“). Zwischen aFGF und bFGF besteht eine 55%ige Sequenzhomologie. Dies lässt eine gemeinsame Abstammung von einem ursprünglichen Gen vermuten. Zwischen FGF und Interleukin I und Interleukin I-beta liegt eine 53 %ige Homologie der Aminosäuresequenz vor. Der bFGF und aFGF haben eine hohe Affinität gegenüber Heparin (Klagsbrun, 1989).

Tabelle 4: Mitglieder der FGF-Familie (Klagsbrun, 1989).

-
- aFGF
 - bFGF
 - Int-2
 - Human-stomach-tumor/K-fgf
 - FGF-5
 - FGF-6
-

Die Molekülstruktur des bFGF besteht aus einem einkettigen, nicht glykosilierten Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 16 kDa. Es enthält 146 Aminosäurereste (Esch et al., 1985). Das bFGF-Gen ist auf dem Chromosom 4 lokalisiert (Gospodarowicz, 1989) und weist eine Größe von 38 kbp auf. Der bFGF enthält 4 Cysteinreste. Zwei von ihnen, Cys 33 und Cys 100, sind in allen Mitgliedern der FGF-Familie determiniert. Diese Cysteinreste sind nicht in Disulfidbrücken eingebunden (Fox et al., 1988); (Seno et al., 1988).

Der aFGF ist ebenfalls ein einkettiges Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 18 kDa. Der aFGF ist auf dem Chromosom 5 lokalisiert (Gospodarowicz, 1989). Anfangs wurden zwei Formen mit 140 Aminosäuren bzw. 134 Aminosäuren gefunden. Nachfolgende Analysen zeigten, dass aFGF ein Polypeptid mit 154 Aminosäuren ist. Rezeptoren für a und bFGF wurden auf vielen Arten von Zelloberflächen gefunden. Die meisten dieser Rezeptoren sind einkettige Polypeptide mit einem Molekulargewicht von 110 kDa bis 165 kDa. Die Mehrzahl der am Tier untersuchten Zellen haben zwei FGF-Rezeptoren an ihrer Oberfläche (Klagsbrun, 1989). Sie gehören zu den Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und übertragen

ihre Signale nach vorangegangener Dimerisierung infolge der Ligandenbindung durch Autophosphorylierung (Klagsbrun, 1989).

Der FGF wirkt auf das Wachstum und auf die Differenzierung verschiedener mesenchymaler und neuralektodermaler Zellen. So wurde die Aktivität des FGF bereits in der Niere, im Gehirn, in der Retina sowie in den Ovarien charakterisiert (Gospodarowicz, 1989). Die Aktivitäten des bFGF sowie des aFGF wurden in verschiedensten Zelltypen nachgewiesen. Der aFGF wurde hauptsächlich im Nervengewebe, im Gehirn, im Hypothalamus sowie in der Retina, in den Nieren, im Knochen und im Uterus nachgewiesen. Der bFGF kommt ubiquitär vor, so unter anderem auch in Entzündungszellen, Gefäßendothelzellen, in Makrophagen, adrenocortikalen Zellen, in der Leber, in Astrozyten, in einigen Tumorzellen, z. B. Chondrosarkom, im Corpus luteum sowie in der Plazenta. So stimuliert FGF in diesen Geweben das Wachstum dieser Zellen. bFGF und aFGF fördern die Einwanderung von Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Gefäßzellen sowie Myoblasten, Chondrozyten und Osteozyten während der Wundheilung. So stimuliert FGF bei Entzündungsreaktionen indirekt die Angiogenese *in vivo* und wird zur Reparatur von Knorpelgewebe aktiv. Folkman (Folkman et al., 1988) postuliert einen Zusammenhang zwischen der Eigenschaft des FGF, zur Förderung der Angiogenese einerseits und der Vaskularisation des Tumors andererseits. Dagegen konnte aber in Tumorzellen keine Sekretion des FGF nachgewiesen werden.

3.3.5.3 Biochemische Charakterisierung des PDGF

PDGF ist einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren im menschlichen Serum. PDGF initiiert in Zellkultur die DNA-Synthese in einer Vielzahl von Mesenchymzellen (Ross et al. 1986), wie den Fibroblasten oder Gliazellen. Studien haben gezeigt, dass PDGF das Verhalten von Zellen auf verschiedene Art und Weise modifiziert. So zum Beispiel initiiert PDGF die Gen-Transkription (Cochran et al., 1983), (Kelly et al., 1993) fördert das „membrane ruffling“ (Ridley et al., 1992), die Zellmigration (Noble et al., 1988), (Stoker & Gherardi, 1991), arbeitet als Neutrophin, verursacht den Kalziumfluss (Cassel et al., 1983), moduliert die Differenzierung (Noble et al., 1988), induziert die Kollagensynthese (Canalis, 1981), (Owen et al., 1984), agiert als Survivalfaktor (Barres et al., 1992) und induziert die Chemotaxis (Grotendorst et al., 1982), (Grotendorst et al., 1982), (Kundra et al., 1994). PDGF wird von verschiedenen Zellen gebildet, so von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und aktivierten Monozyten und Makrophagen und ist an der Wundheilung beteiligt

(Steenfos, 1994). PDGF wurde erstmals aus menschlichen Thrombozyten gewonnen, um ihre mitogene Wirkung an Fibroblasten in Kultur als Basis für biologische Assays zu gebrauchen (Antoniades, et al. 1979), (Heldin, et al. 1979). Es wurde gezeigt, das PDGF aus zwei verschiedenen, gegenläufigen Polypeptidketten besteht, die durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Heldin, et al. 1981).

Die dreidimensionale Form ähnelt einem flachen Trog und ist mit der des nerv growth factors (McDonald, et al. 1991) und des TGF β 2 (Daopin, et al. 1992) identisch. Durch die Faltung des PDGF-Monomers (B) im Homodimer (BB) entstehen drei charakteristische Loops an den Enden des Moleküls (Oefner et al., 1992), die wahrscheinlich für die Bindung an seine Rezeptoren verantwortlich sind (Heldin, 1993).

Unter reduzierenden Bedingungen zerfällt das Dimer PDGF in seine monomeren Untereinheiten, von welchem das größere (15000 bis 17000 Da) als PDGF-A und das kleinere (14000 Da) als PDGF-B bezeichnet wird. Alle drei möglichen dimeren Isoformen des PDGF (AA, BB, AB) können aus humanen Thrombozyten isoliert werden. Das PDGF-AB ist dabei das am häufigsten vorkommende, jedoch am schwierigsten zu untersuchende Dimer. Jede der verschiedenen Isoformen besitzt *in vivo* sowie auch *in vitro* nachweisbare biologische Aktivität, wobei PDGF-AA die niedrigste mitogene Potenz besitzt. Es musste erst eine hohe Reinheit der Isoformen erreicht werden, um vergleichende Studien durchführen zu können (Hoppe et al., 1989), (Hoppe et al., 1990), (Hoppe, Weich, Eichner & Tatje, 1990). Seitdem dieses Ziel erreicht wurde, haben eine Reihe von Untersuchungen die verschiedenen Potenzen der PDGF-Isoformen in Chemotaxis und DNA-Proliferationstests und ihren unterschiedlichen Einfluss auf die Freisetzung von Inositol 3, 4, 5-triphosphat, der Produktion von Diacylglycerol sowie der Ca^{2+} -Immobilisation bestätigt (Nister et al., 1988), (Hosang et al., 1989), (Reilly & Broski, 1989), (Siegbahn et al., 1990). Es wurden zwei Rezeptorpopulationen für PDGF gefunden. Der PDGF- α -Rezeptor bindet alle PDGF-Isoformen, der PDGF- β -Rezeptor bindet lediglich das PDGF-BB-Dimer (Hart et al., 1990), (Heldin et al., 1988). Dies kann eine Erklärung für die unterschiedlichen Effekte der PDGF-Isoformen sein. PDGF- α und PDGF- β sind transmembrane Proteine mit intrinsischer Tyrosin-Kinase-Aktivität. Die Bindung am Rezeptor führt zu einer Dimerisation der α - und β -Untereinheiten zu drei möglichen Rezeptordimeren. Die Dimerisation, so wird vermutet, ist notwendig für die Rezeptorautophosphorylierung und für die Aktivierung von Kinasen, welche zu

einem Signal im Inneren der Zelle transformiert werden und zu einer Reihe molekularer Interaktionen führten (Claesson-Welsh, 1994).

PDGF-A- und PDGF-B-Proteinketten sind auf zwei verschiedenen Genen verschlüsselt. Diese Gene sind auf zwei unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. Studien haben gezeigt, dass diese zwei Gene als Substrat für unterschiedliche Regulationsmechanismen dienen und somit die Ketten in verschiedenen Zelltypen in unterschiedlichen Mengen produziert werden. Beide PDGF-Moleküle werden initial als ungewöhnlich lange Precursor-Moleküle gebildet und werden später intrazellulär zu den endgültigen PDGF-Ketten umgebildet (Robbins et al., 1985).

Die Synthese, die Dimerisation sowie die Bearbeitung der A-Kette führen zur Sekretion. Die Expression der B-Kette hat hingegen nicht zwangsläufig die Sekretion biologisch aktiven Materials zur Folge.

Wenn die Dimerisierung zum korrespondierenden Homodimer führt, verbleibt ein großer Teil dieser exprimierten PDGF-BB-Moleküle in enger Bindung zur zytoplasmatischen Membran. Sie werden als Resultat elektrostatischer Interaktionen extrazellulär an der Plasmamembran gebunden. Nur ein kleiner Teil des PDGF-BB wird für die Zellentwicklung freigegeben (LaRochelle et al., 1990), (LaRochelle et al., 1991), (Ostman et al., 1991). Für den PDGF-AA bestehen zwei unterschiedliche Transkriptionsorte, welche in der An- oder Abwesenheit eines 69-bp-Segmentes in der 3'-Region differieren und die Basis für ein „alternative splicing“ darstellen. Dieser Einschub führt zur Bildung eines kurzen PDGF-A_s mit 110 Aminosäuren und einem langen PDGF-A_l mit 125 Aminosäuren. Beide Varianten werden als normale zelluläre Proteine erkannt, wobei die kurze Form des PDGF häufiger vorkommt (Young et al., 1990).

3.3.6 Wirkungsweise der Wachstumsfaktoren auf das Ovar und den Follikel

3.3.6.1 Vorkommen und Physiologie des EGF

EGF ist der am genauesten charakterisierte und untersuchte Wachstumsfaktor. Er wurde erstmals 1962 aus Speicheldrüsen der Maus isoliert und wurde zunächst als Urokinase charakterisiert. Die Rezeptoren des EGF sind im Gewebe des Gastrointestinaltraktes weit verbreitet und ebenfalls in der Haut und seinen Anhangsgebilden zu finden. Ein Bildungsort des EGF sind Thrombozyten, wobei EGF hier auf die Wundheilung Einfluss nimmt (Steenfos, 1994). Daneben gibt es weitere Thesen über den Bildungsort des EGFs, so gelang der immunhistochemische Nachweis in humanen Oozyten, Granulosazellen und

Thekazellen (Maruo et al., 1993), (Budnik & Mukhopadhyay, 1996), in denen das EGF verschiedene Aufgaben übernimmt. Die Granulosazellen sind in der Lage, EGF-Rezeptoren mit einer hohen Affinität gegenüber EGF zu bilden (Vlodavsky et al., 1978). Die EGF-Rezeptoren scheinen unter einem stimulativen oder inhibitorischen Einfluss von Gonadotropinen zu stehen (Giordano et al., 1992). Dieser unterschiedliche Effekt bei der Modifikation der Bindungsstellen von EGF nach FSH-Behandlung *in vivo* und *in vitro* scheint mit der Differenzierung der Granulosazellen im Zusammenhang zu stehen. EGF kann die FSH-Bindung zu seinem eigenen Rezeptor steigern. Der Anstieg von EGF und EGFR stimmt zeitlich mit dem Erwerb der Fähigkeit des Follikels zur Steroidgenese überein (Gore-Langton & Armstrong, 1988). Diese komplexen Beziehungen, die zwischen Wachstumsfaktoren und Gonadotropinen bestehen, lassen vermuten, dass durch die reziproke Verstärkung oder Abschwächung der hormonellen Signale die Modifikation bei Überschuss oder Mangel an Hormonen ohne Änderung der zellulären Aktivität bewirkt werden kann. Ausgehend von dieser These ist es plausibel, dass trotz normaler LH- oder FSH-Konzentrationen Imbalancen bei Fehlen dieses Modulationssystems auftreten (Giordano et al., 1992).

3.3.6.2 Vorkommen und Physiologie des FGF bzw. bFGF

Schwerpunkte der bisherigen Untersuchungen des FGF bildeten hauptsächlich Tierversuche, so dass die Ergebnisse nicht ohne Vorbehalt auf das menschliche Ovar übertragbar sind. Die Aktivitäten des FGF sind für die Follikelentwicklung und für deren Selektion erforderlich. Sie beinhalten die Angiogenese, die Freigabe von Plasminogenaktivatoren und das Wachstum der Granulosazellen. FGF wird von den Granulosazellen, Lutealzellen und Thekazellen produziert (Wandji et al., 1996), (Guthridge et al., 1992).

Die Granulosazelle ist in der Lage, FGF-Gene zu exprimieren und biologisch aktives FGF zu bilden. Somit kommt dem FGF eine Bedeutung als autokriner sowie als parakriner Faktor für die Differenzierung der Granulosazellen zu (Neufeld et al., 1987).

Des Weiteren hemmt FGF reversibel das Aromatasesystem der Granulosazelle und verhindert somit die Umwandlung von Progesteron in Östrogene und stimuliert gleichzeitig die Progesteronsynthese (Baird & Hsueh, 1986). Die Fähigkeit von FGF, die Östrogenbildung in den Granulosazellen zu unterbrechen und die Progesteronsynthese zu fördern, könnte in Verbindung mit den hormonellen Ereignissen stehen, die der Bildung des Corpus luteum und der Follikelreifung

vorausgehen. Jeder dieser Prozesse ist stark von der zwischenzeitlichen Präsenz von Progesteron ohne Östrogen bzw. umgekehrt abhängig. bFGF gehört damit zu der Gruppe von Wachstumsfaktoren, die die Aktivität des Aromatasesystems beeinflussen. Zu dieser Gruppe gehören auch IGF-I, Insulin, EGF, TGF und TGF- β . Es wird weiterhin vermutet, dass FGF eine wichtige Funktion bei der Ovulation erfüllt. Bereits 1916 wurde postuliert, dass die Ovulation kein rein mechanischer Vorgang ist, sondern vielmehr einen durch proteolytische Enzyme gesteuerten Vorgang darstellt (LaPolt et al., 1990). So scheint der Plasminogenaktivator für die Ruptur des Follikels verantwortlich zu sein. Gestützt wird diese These durch die Korrelation der Produktion von Plasminogenaktivator in Granulosazellen der Ratte und bFGF (LaPolt et al., 1990). Das Substrat für dieses Enzym Plasminogen sowie das Produkt der Reaktion, welches durch den Plasminogenaktivator katalysiert wurde, fand sich in der Follikelflüssigkeit. Plasmin bewirkte eine Schwächung der Follikelwand *in vitro*. Weiterhin stellte sich *in vitro* bei der Exposition von Granulosazellkulturen mit LH vom Schwein und cAMP eine Steigerung von extrazellulärem Plasminogenaktivator dar. Diese Beobachtungen stärken die Vermutung über die Rolle von Plasminogenaktivator bei der Ovulation. bFGF ist einer der Wachstumsfaktoren, die Proteasen und Kollagenasenaktivitäten in Zellen fördern. FGF stimuliert die Produktion von Plasminogenaktivator sowie von Kollagenasen und ist ebenfalls in der Lage, die Bildung von Plasminogenaktivator-Inhibitoren zu senken (Montesano et al., 1986).

FGF ist wahrscheinlich an der Kontrolle der Oozytenreifung und des Wachstums beteiligt. So wie bFGF die Zahl der Granulozyten steigert, so steigert FGF die Menge des ebenfalls von der Granulosazellschicht produzierten KL. Dieses Protein bindet am c-kit, einem Rezeptor, der von dem Oozyt gebildet, an seiner Membran exprimiert wird und auf diesem Wege das Oozytenwachstum anregt. Auch bei der Apoptose der Oozyten wird bei dem FGF gemeinsam mit dem EGF eine anti-apoptotische Funktion diskutiert (Eppig & O'Brien, 1996), (Wandji et al., 1996). Eine weitere Bedeutung kommt dem FGF durch seine angiogenetischen Eigenschaften zu (Klagsbrun, 1989).

3.3.6.3 Vorkommen und Physiologie des PDGF

PDGF stimuliert in Kultur das Wachstum normaler Zellen, z.B. von Fibroblasten, glatten Muskelzellen der Gefäße und Gliazellen. PDGF fördert die Zellmigration und erfüllt auch metabolische Aufgaben. Zu nennen sind der Aminosäuretransport, die Proteinsynthese, die Cholesterolestersynthese oder die Prostazyklinsynthese.

Er ist auch in der Lage, Rezeptorbindungen von anderen aktiven Komponenten zu modulieren, wie die des luteinisierenden Hormons, des EGF, des low density lipoproteins und des Somatomedins C. Die Wirkung von PDGF am Ovar wurde in der Vergangenheit vorwiegend im Tierversuch demonstriert. Es wurde gezeigt, dass PDGF zusammen mit anderen Wachstumsfaktoren die Entwicklung des Follikels beeinflusst und proliferativ wie auch differenzierend auf die Granulosazelle des Schweins *in vitro* wirkt (Anderson & Lee, 1993). May (May et al., 1990) postulierte, dass PDGF selber nur gering mitogen auf die Granulosazelle wirkt, aber die EGF-vermittelte Granulosazellproliferation steigert. Der Mechanismus, der zu diesem Effekt führt, ist nicht geklärt. In Granulosazellen von Vögeln steigert PDGF zusammen mit FGF, EGF, TGF dosisabhängig die Plasminaktivatoraktivität. Bei Untersuchungen von Granulosazellen der Ratte steigerte PDGF die FSH-abhängige LH-Rezeptorinduktion (Blair et al., 1988).

4 Material und Methoden

4.1 Probandinnencharakterisierung

Zur Untersuchung kamen in der vorliegenden Arbeit 27 Frauen, die sich wegen unerfülltem Kinderwunsch in der Frauenklinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena einer IVF-Behandlung unterzogen haben.

Die Probandinnen wurden nach der Sterilitätsursache in drei Gruppen unterteilt. Ihr gehören neun sterile Patientinnen mit unauffälliger Anamnese (n), zehn ovulatorische Frauen mit polyzystisch verändertem Ovar und acht anovulatorische Frauen mit polyzystischem Ovar Syndrom an (Tab. 6). Die Einschlusskriterien sowie das Alter und der BMI der Patientinnen zum Zeitpunkt der Follikelpunktion sind ebenfalls aus der Tabelle 6 zu entnehmen. Die Verteilung der Sterilitätsfaktoren in den einzelnen Gruppen ist aus der Tabelle 7 ersichtlich.

Von den 27 ausgewählten Frauen aus 37 Zyklen wurden 37 Seren und 134 Follikelflüssigkeiten analysiert.

Tabelle 5: Verwendete Abkürzungen für die Darstellung der Gruppen

-
- n = sterile Frauen ohne PCO und mit unauffälliger Endokrinologie
 - PCO = ovulatorische Frauen mit polyzystisch verändertem Ovar
 - PCOS = anovulatorische Frauen mit polyzystischem Ovar-Syndrom
-

Tabelle 6: Einschlusskriterien sowie Alter und BMI für die Patientinnengruppen

Gruppe (Anzahl)	n = (9)	PCO (10)	PCOS (8)
Zyklus	ovulatorisch	ovulatorisch	anovulatorisch
Ultraschallbefund	normal	polyzystisch	polyzystisch
Ovar		verändert	verändert
Alter (Median)	31,9	29,7	29,8
BMI (Median)	21,6	23,9	24,6

*Body-Mass-Index = (Körpergewicht in kg)/(Körpergröße in m)²

Tabelle 7: Verteilung der Sterilitätsfaktoren in den Gruppen

Sterilität	n = 9		PCO = 10		PCOS = 8	
	primär	sekundär	primär	sekundär	primär	sekundär
andrologisch	4	2	6	2	2	1
tubar	0	2	1	1	2	2
idiopathisch	1					
endokrinologisch						1

4.1.1 Angewendete Stimulationprotokolle

Alle Frauen wurden zur Induktion einer multiplen Follikelreifung im Rahmen eines IVF-Programms mit GNRH- Analoga und HMG-Stimulation (long-, short- oder ultra-short-Protokoll) behandelt.

4.2 Methode zur Eizellgewinnung

Zur Eizellgewinnung wird die inaugurierte Methode der transvaginalen ultraschallgesteuerten Follikelpunktion genutzt (Krebs, 1994). Dabei wird eine Ultraschallsonde in die Vagina eingeführt. Mit Hilfe einer auf dem Bildschirm einprogrammierten Punktionslinie wird der zu punktierende Follikel positioniert. Mit einem schnellen Stoß wird eine Nadel in den Follikel eingeführt und der Follikelinhalt aspiriert. Die aufgesuchte Eizelle wird nach ihrem Reifegrad eingeordnet. Nachdem die Eizelle in ihrer Punktionsflüssigkeit aufgesucht wurde, wird sie in ein Kulturmedium überführt. Dies ist zugleich das Fertilisierungsmedium (Krebs, 1994).

4.2.1 Probengewinnung

Die Follikelflüssigkeiten wurden mittels transvaginalen Ultraschalls zum Zeitpunkt der Oozytenaspiration gewonnen. Die Frauen befanden sich dabei in einer intravenösen Narkose. Zeitgleich wurde das Serum entnommen. Bedingung war eine klare Follikelflüssigkeit. Blutige Aspiarte wurden verworfen. Um Überstände der Granulosazellschicht zu entfernen, wurde die Flüssigkeit bei 10000 U/min zentrifugiert. Ein Teil der Follikelflüssigkeit und des Serums wurde zur Bestimmung weiterer Parameter laborchemisch im Institut für Klinische Chemie der FSU Jena und im Labor der Kinderklinik der FSU Jena untersucht. Die verbleibenden 134 Follikelflüssigkeiten aus 37 Zyklen und die entsprechenden 37 Seren wurden zu je 0,5 ml portioniert, um ein mehrmaliges Auftauen zu vermeiden und bei – 18° C eingefroren.

4.2.2 Analyisierte Hormone im Serum und Follikel

Um einen Zusammenhang zwischen dem BMI der Patientinnen bzw. den Konzentrationen der Wachstumsfaktoren im Follikel und Serum zu untersuchen, wurden folgende Hormone der analysierten Follikelflüssigkeiten im Institut für Klinische Chemie der FSU Jena bestimmt (Tab. 8). Die Probengewinnung erfolgte zeitgleich zur Follikelpunktion.

Tabelle 8: Analyisierte Hormone

-
- E2
 - FSH
 - Progesteron
 - DHEAS
 - SHBG
 - freies Testosteron
 - Androstendion
-

4.3 Testmethode

Zur Anwendung kam ein ELISA-Test der Firma R&D Systems, Inc. zur Bestimmung der Wachstumsfaktoren bFGF, EGF und PDGF-AB in Follikelflüssigkeit und Serum. Zur Bestimmung der Konzentration wurde ein Microplate Reader EL 311 vom Gerätetyp BEP 3 der Firma Behring eingesetzt.

Der ELISA-Test nutzt die Tatsache aus, dass ein Enzym, welches an einen Antikörper gekoppelt ist, nicht seine Aktivität verliert und der enzymkonjugierte Antikörper seine Bindungsfähigkeit beibehält. Auf diese Weise lassen sich enzymatische und immunologische Reaktionen miteinander kombinieren und machen somit eine quantitative Bestimmung von Peptiden möglich.

Es kam ein jeweils für den zu untersuchenden Wachstumsfaktor spezifischer monoklonaler Antikörper, der auf einer Mikrotiterplatte fixiert ist, zum Einsatz. Der in den Standards und Proben enthaltene Wachstumsfaktor wird von dem immobilisierten Antikörper gebunden. Nach dem Dekantieren der nichtkonjugierten Substanzen wurde ein polyklonaler Antikörper aufgebracht. Dieser verbindet sich mit dem Antigen-Antikörper-Komplex. Nach einem erneuten Waschgang wurde eine Substratlösung hinzugefügt. Die danach zu beobachtende Farbentwicklung vollzieht sich proportional zu der Menge des enthaltenen Wachstumsfaktors. Die

Farbentwicklung wurde gestoppt und die optische Dichte der Lösung gemessen. Die verwendeten Reagenzien sind aus Tabelle 9 zu entnehmen. Die Eigenschaften des ELISA sind in Tabelle 10 dargestellt.

4.3.1 Verwendete Reagenzien der Immunoassays

Tabelle 9: Reagenzien des Immunoassays

Reagenzien	EGF	BFGF	PDGF
Microtiterplatte mit 96 Plätzen			
Konjugat	21 ml polyklonaler Antikörper gegen EGF	21 ml polyklonaler Antikörper gegen bFGF	21 ml polyklonaler Antikörper gegen PDGF-BB
Standard	1,25 ng rekombinanter humaner EGF	3 mal 1280 ng rekombinanter humaner bFGF	3 mal 4 ng rekombinanter humaner PDGF-AB
Assay-Lösung (gepufferte Proteinbase)	6 ml RDG1	6 ml RD1J	6 ml RD1G
Calibrator-Lösung	3 Flaschen mit jeweils 21 ml RD5 (gepufferte Proteinbase)	21 ml RD6J (tierisches Serum)	3 Flaschen mit jeweils 21 ml RD5 (gepufferte Proteinbase)
Color-Reagenz A, B 12,5ml Wasserstoffperoxid			
Stop-Lösung 6ml 2N Salzsäure			

Tabelle 10: Nachweisgrenzen, Sensitivität und Spezifität der verwendeten ELISA- Tests

	Spezifität	Sensitivität	Kreuzreaktivität
EGF (pg/ml)	50	0,7	Keine
bFGF (pg/ml)	50	1	Keine
PDGF-AB (pg/ml)	50	8,4	Keine

4.3.2 Durchführung

Zu Beginn wurde sich jeweils über die Ordnungsmäßigkeit und Gebrauchsfertigkeit der Tests vergewissert.

Die Proben und die Bestandteile des Tests wurden der Raumtemperatur angeglichen. Vor Verwendung der Proben wurden sie mit Hilfe des Vortex

sorgfältig vermischt. Zuerst wurden die 20 ml des Waschpuffers mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Zur Durchführung des Nachweises des PDGF-AB mussten 20 µl des Serums bzw. der Follikelflüssigkeit mit 980 µl verdünnt werden, um eine 50fach niedrigere Konzentration zu erhalten. Zur Bestimmung der FGF- und EGF-Konzentration war eine Verdünnung nicht notwendig. Die Standards (rekombinant human bFGF, EGF oder PDGF-AB) wurden gemäß der Testanleitung gefertigt.

Zur Bestimmung der Wachstumsfaktoren wurde jede Vertiefung mit jeweils 50 µl gepufferter Base vorbehandelt, um anschließend 200 µl des Standards bzw. der Proben hinzuzugeben. Es folgte eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Ablauf dieser Zeit wurde jedes Tüpfelchen mit je 400 µl Waschpuffer gereinigt. Dieser Arbeitsschritt wurde 3 mal wiederholt. Anschließend wurden in die Tüpfelchen 200 µl des polyklonalen Antikörpers gegen das jeweilige Zytokin, welches mit Meerrettichperoxidase verbunden ist, hinzugefügt. Mit einer Folie abgedeckt, inkubierte das Substrat für 2 Stunden. Danach wurde die Titerplatte 4-mal mit Waschpuffer gewaschen. Als nächster Arbeitsschritt wurden 200 µl der Substratlösung, die höchstens 15 min vor Gebrauch durch das Vermischen der Farbreagenzien A und B hergestellt wurde, aufgebracht und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit kam es zur Gelbfärbung der Reagenzien, entsprechend der enthaltenen Konzentration an bFGF, EGF und PDGF-AB. Nach dem Hinzufügen von jeweils 50 µl Stopplösung (2 N-Salzsäure) wurde die Extinktion bzw. die Konzentration in pg/ml auf einem Microplate Reader bei 450 nm bestimmt. Mit Hilfe einer Standardkurve, die durch Mitführung von Kontrollflüssigkeiten bekannter Konzentration überprüft wurden, konnte die Konzentration an EGF, bFGF und PDGF-AB im Serum bzw. der Follikelflüssigkeiten der Probandinnen ermittelt werden.

4.3.3 Statistik

Die Standardwerte wurden doppelt bestimmt. Die Messung der Proben erfolgte einfach. Bei der Ermittlung der Werte gingen die Sensibilitäten der Tests mit ein (Tab. 11). Alle Werte unter der für den Test festgeschriebenen Nachweisgrenze wurden nicht berücksichtigt und galten als nicht nachgewiesen. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch das Statistikprogramm SPSS 8,0 für Windows 2573853. Zur Feststellung der Verteilungsform wurden Streudiagramme und Histogramme zu den einzelnen Messwerten erstellt. Es ergab sich für alle Werte eine

nichtparametrische Verteilungsform. Die verwendeten nichtparametrischen Tests sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 11: verwendete nichtparametrische Tests

<ul style="list-style-type: none">• Rangsummentest nach Wilcoxon für abhängige Variablen• Rangsummentest nach Man-Whitney für unabhängige Variablen• Spearman-Korrelation• Boxplot als graphische Darstellung
--

5 Ergebnisse

5.1 Analyse der Wachstumsfaktoren im Serum

PDGF-AB erreichte Konzentrationen im Serum von 238,7 pg/ml bis 1610,9 pg/ml und war damit zu 100 % im Serum nachweisbar (Tab. 12).

Die für EGF ermittelten Serumkonzentrationen ergeben einen Minimalwert von 50,9 pg/ml und einen Maximalwert von 670,7 pg/ml und lagen damit zu 100 % für EGF über der Nachweisgrenze (Tab. 12).

bFGF war in 22 Proben des Serums enthalten. In 15 Proben (40,5 %) lagen die Konzentrationen für bFGF unterhalb der Nachweisgrenze von 1 pg/ml. Die Maximalkonzentration für bFGF betrug 26,8 pg/ml, das Minimum 1,25 pg/ml (Tab. 12.).

PDGF-AB, EGF und bFGF lagen unterschiedlich konzentriert im Serum vor. Die höchsten Werte im Serum waren für PDGF-AB, die niedrigsten für bFGF nachweisbar.

Tabelle 12: Statistische Verteilung der Konzentrationen von PDGF-AB, EGF und bFGF im Serum

		PDGF Serum (pg/ml)	EGF Serum (pg/ml)	bFGF Serum (pg/ml)
Anzahl	oberhalb der Nachweisgrenze	37	37	22
	unterhalb der Nachweisgrenze	0	0	15
Mittelwert		827,6	289,6	7,86
Median		738,9	274,9	5,0
Minimum		232,2	50,9	1,25
Maximum		1610,9	670,7	26,8
Perzentile	0	0	0	0
	25	516,9	163,95	2,64
	50	738,9	274,9	5,0
	75	1124,05	371,3	10,25
	100	1610,9	670,7	26,8

Tabelle 13: Gesamtverteilung der verarbeiteten Fälle von PDGF-AB, bFGF und FGF im Serum

	Anzahl der ausgewerteten Seren N = 37			
	nachweisbar		nicht nachweisbar	
	Anzahl	Prozent %	Anzahl	Prozent %
PDGF-AB -Serum	37	100	0	0
EGF-Serum	37	100	0	0
bFGF-Serum	22	59,5	15	40,5

5.2 Analyse der Wachstumsfaktoren in der Follikelflüssigkeit

In den für PDGF-AB zu untersuchenden Proben der Follikelflüssigkeit konnte in 8 Fällen (6%) PDGF-AB oberhalb der Nachweisgrenze ermittelt werden. 126 der Proben (94%) enthielten kein PDGF-AB. In 68 der 126 Follikelflüssigkeiten waren messbare Konzentrationen für PDGF-AB enthalten, diese lagen aber unterhalb der Nachweisgrenze. Die Maximalkonzentration für PDGF betrug 58,9 pg/ml (Tab. 14 und 15).

Die Konzentrationen für EGF in der Follikelflüssigkeit reichten von 0,8 pg/ml bis 20 pg/ml. Dabei war in 29,0 % der Fälle (39 Proben) EGF nachweisbar. 95 der Proben (71 %) waren hingegen negativ, wobei davon 50 Proben in ihren Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze lagen ($0 < c < 0,8$ pg/ml) (Tab. 14 und 15).

93,3 % der Proben waren für bFGF in der Follikelflüssigkeit positiv. Die Konzentrationen reichten von 2,8 pg/ml bis 546,0 pg/ml. 5 Proben (3,7 %) lagen unterhalb der Nachweisgrenze ($c = 0$ pg/ml) (Tab. 14 und 15).

Aus dem Vergleich der Wachstumsfaktoren geht hervor, dass bFGF am höchsten konzentriert in der Follikelflüssigkeit vorliegt. Die Verteilung der Konzentrationen ist in den Diagrammen 1 und 2 graphisch dargestellt.

Tabelle 14: Gesamtverteilung von PDGF-AB, EGF und bFGF im Follikel

Anzahl der ausgewerteten Follikelflüssigkeiten N = 134				
	nachweisbar		nicht nachweisbar	
	N	Prozent %	N	Prozent %
PDGF-AB -Follikel	8	6	126	94
EGF-Follikel	39	29	95	71
bFGF-Follikel	129	93,3	5	3,7

Tabelle 15: Übersicht über die Konzentrationen der Wachstumsfaktoren der Follikelflüssigkeit

		PDGF-AB Follikel (pg/ml)	EGF Follikel (pg/ml)	bFGF Follikel (pg/ml)
Anzahl	oberhalb der Nachweisgrenze	8	39	129
	unterhalb der Nachweisgrenze	126	95	5
Mittelwert		21,46	2,6	102,9
Median		12,6	1,9	83,0
Minimum		8,8	0,8	2,8
Maximum		58,9	20,0	546,0
Perzentile	0	0	0	0
	25	10,92	1,1	35,25
	50	12,55	1,9	83,0
	75	30,25	3,0	135,17
	100	58,9	20,0	546,0

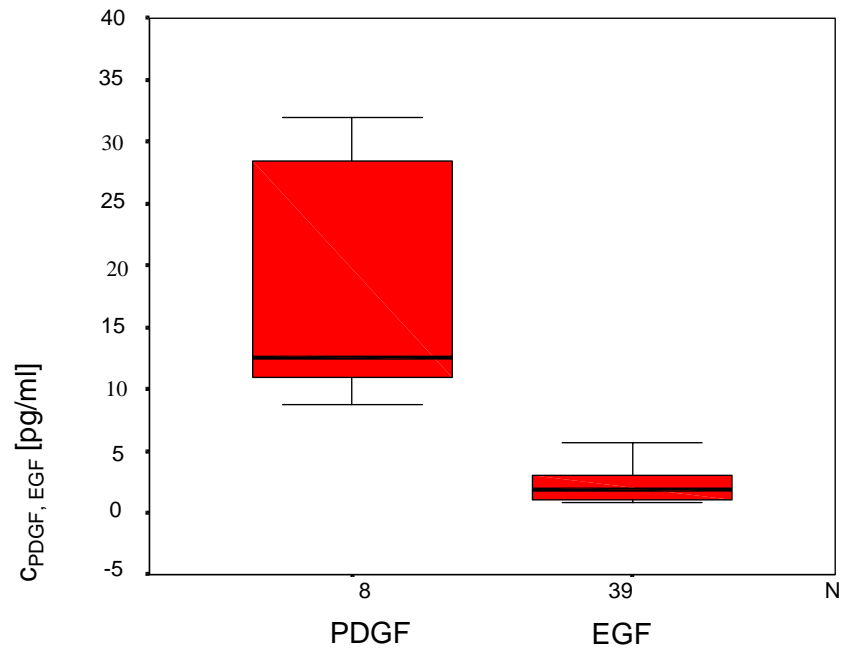


Diagramm 1: Gesamtkonzentrationen von PDGF-AB und EGF im Follikel

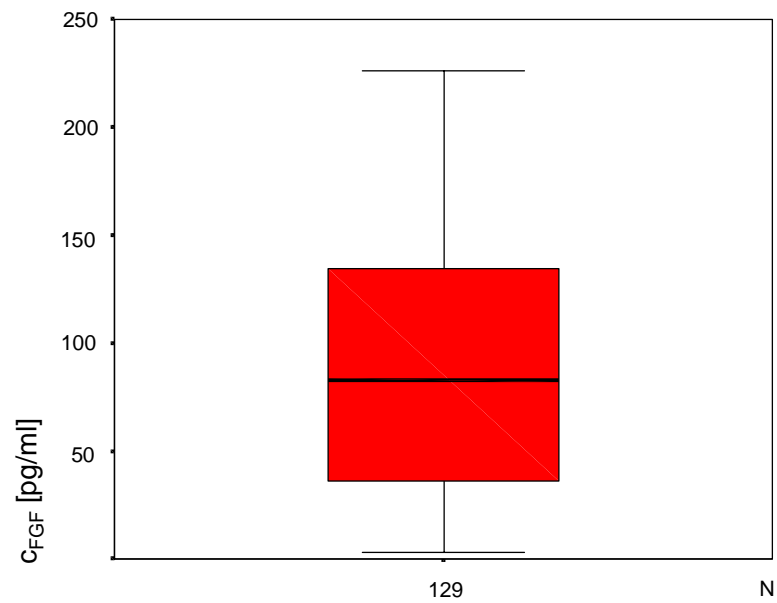


Diagramm 2: Gesamtkonzentration von bFGF im Follikel

5.3 Vergleich der Konzentrationen von Serum und Follikelflüssigkeit

Der folgende Vergleich wurde zum einem unter Beachtung der im verwendeten Test festgelegten Nachweisgrenzen und unter Vernachlässigung der Grenzen geführt.

Für beide Auswertungen gilt ein im Serum ausnahmslos höher konzentriertes PDGF-AB und EGF als in der Follikelflüssigkeit.

In der Mehrzahl, bei 85 Proben, war bFGF unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze im Serum niedriger konzentriert als in der Follikelflüssigkeit. In einem Fall war die Konzentration für bFGF unter Beachtung der Nachweisgrenzen gleich der Konzentration im Follikel. In vier der untersuchten Proben war bFGF in den Seren höher konzentriert.

Unter Einbeziehung der Werte ohne Beachtung der Nachweisgrenze ergab sich ein ähnliches Bild. In 124 Fällen war bFGF im Follikel höher, in 6 Fällen weniger und in 4 Fällen gleich konzentriert. Aus diesen Ergebnissen ist ersichtlich, dass die Konzentrationen von PDGF-AB sowie EGF im Serum gegenüber der Follikelflüssigkeit erhöht sind. Im Gegensatz dazu sind die Werte für bFGF in der Follikelflüssigkeit signifikant höher. Eine Übersicht über die Ergebnisse ist aus der Tabelle 16 und 17 zu entnehmen. Eine Gegenüberstellung der Konzentrationen ist aus den Diagrammen 3 bis 5 zu entnehmen.

Tabelle 16: Vergleich der Konzentrationen in Serum und Follikelflüssigkeit für PDGF-AB, EGF und bFGF unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze

		Anzahl der Proben
PDGF-AB-Serum, PDGF-AB-Follikel	PDGF-Serum < PDGF-Follikel	0
	PDGF-Serum > PDGF-Follikel	8
	PDGF-Serum = PDGF-Follikel	0
EGF-Serum, EGF-Follikel	EGF-Serum < EGF-Follikel	0
	EGF-Serum > EGF-Follikel	39
	EGF Serum = EGF Follikel	0
bFGF-Serum, bFGF-Follikel	bFGF-Serum < bFGF-Follikel	85
	bFGF-Serum > bFGF-Follikel	4
	bFGF-Serum = bFGF-Follikel	1

Tabelle 17: Vergleich von Serum und Follikelflüssigkeit von PDGF-AB, EGF und bFGF ohne Berücksichtigung der Nachweisgrenze

		Anzahl der Proben
PDGF-AB-Serum, PDGF-AB-Follikel	PDGF-Serum < PDGF-Follikel	0
	PDGF-Serum > PDGF-Follikel	134
	PDGF-Serum = PDGF-Follikel	0
EGF-Serum, EGF-Follikel	EGF-Serum < EGF-Follikel	0
	EGF-Serum > EGF-Follikel	134
	EGF Serum = EGF Follikel	0
FGF-Serum, bFGF-Follikel	bFGF-Serum < bFGF-Follikel	124
	bFGF-Serum > bFGF-Follikel	6
	bFGF-Serum = bFGF-Follikel	4

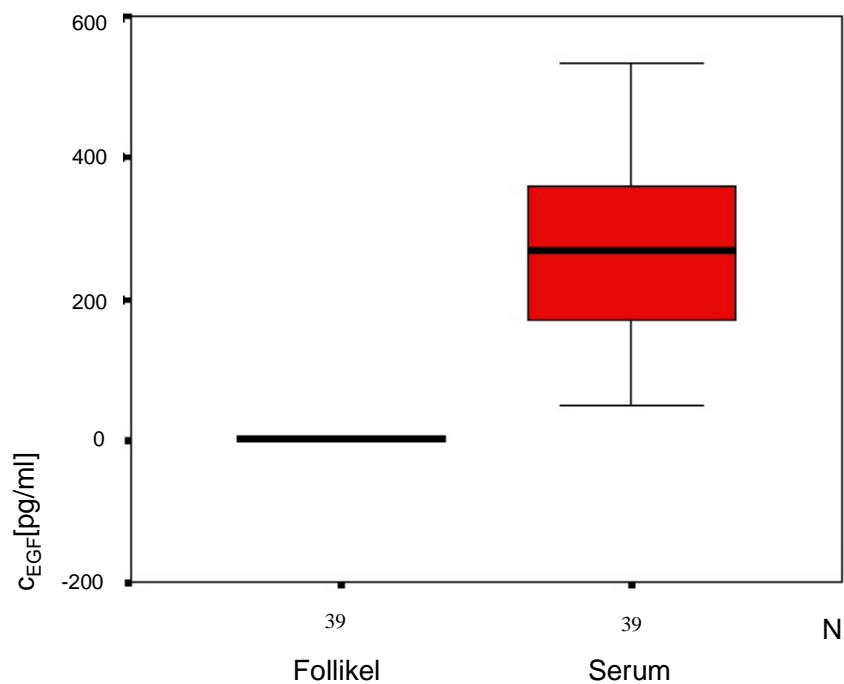


Diagramm 3: Gegenüberstellung der Konzentrationen von EGF im Serum und im Follikel

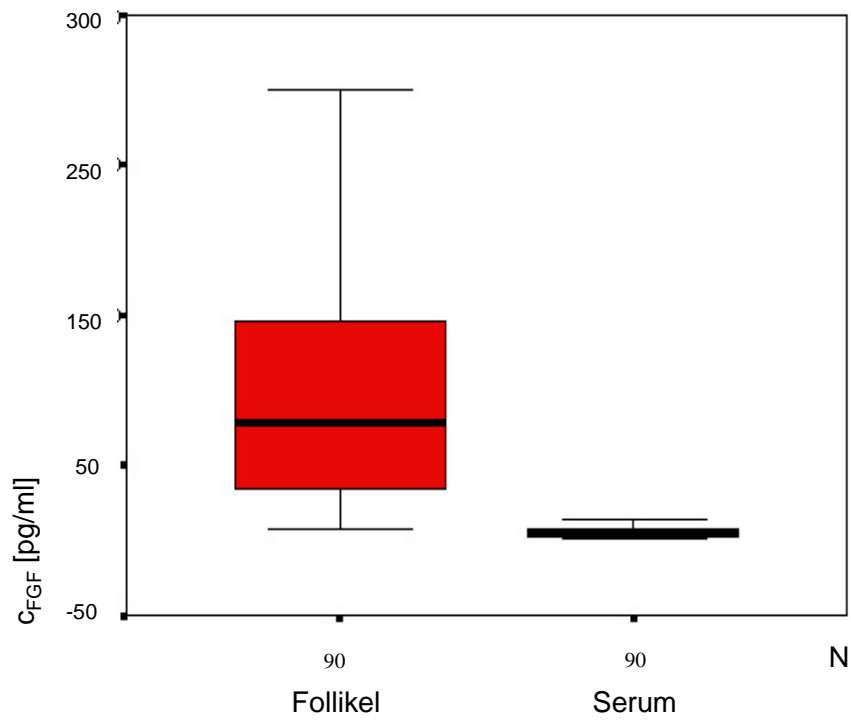


Diagramm 4: Gegenüberstellung der Konzentrationen von bFGF im Serum und im Follikel

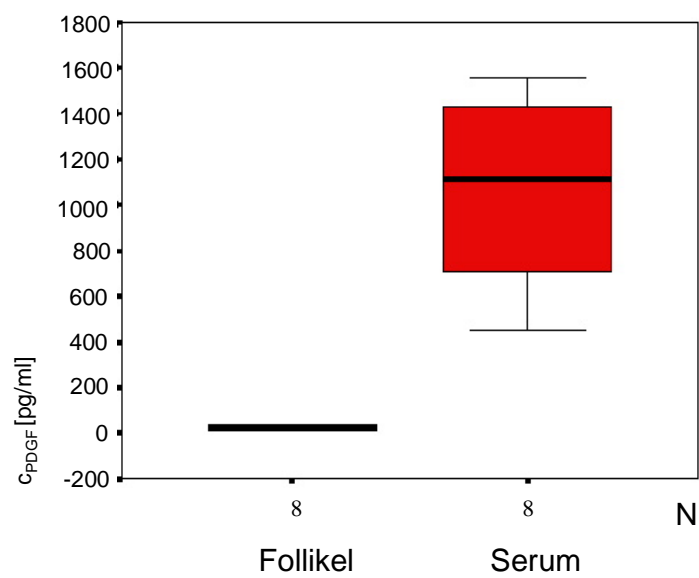


Diagramm 5: Gegenüberstellung der Konzentrationen von PDGF-AB im Serum und im Follikel

5.3.1 Vergleich der Gruppen n, PCO und PCOS im Serum

Zunächst wurden die Seren von PDGF-AB, EGF und FGF untersucht. Dabei zeigen die Seren bei PDGF-AB, EGF und bFGF keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Gruppen n, PCO und PCOS (Diag. 6, 7 und 8).

Tabelle 18: Ausgewertete Fälle von PDGF im Serum

Anzahl der ausgewerteten Seren für PDGF-AB N = 37					
		nachweisbar		nicht nachweisbar	
	Gruppe	N	Prozent %	N	Prozent %
PDGF-AB Serum	n	10	100	0	0
	PCO	17	100	0	0
	PCOS	10	100	0	0

PDGF-AB konnte zu 100% in allen Gruppen nachgewiesen werden (Tab.18). In der Gruppe der sterilen Frauen mit unauffälliger Anamnese ergab sich in Bezug auf die Konzentrationen ein Median von 979,2 pg/ml, ein Minimalwert von 560,2 pg/ml und ein Maximalwert von 1529,4 pg/ml. In der Gruppe der Frauen mit PCO betrug der Median 710,3 pg/ml, der Minimalwert 232,2 pg/ml und der Maximalwert 1601,9 pg/ml. Bei den Frauen mit PCOS ergab sich ein Median von 671,5 pg/ml, ein Minimum von 299,2 pg/ml und ein Maximum von 1553,7 pg/ml.

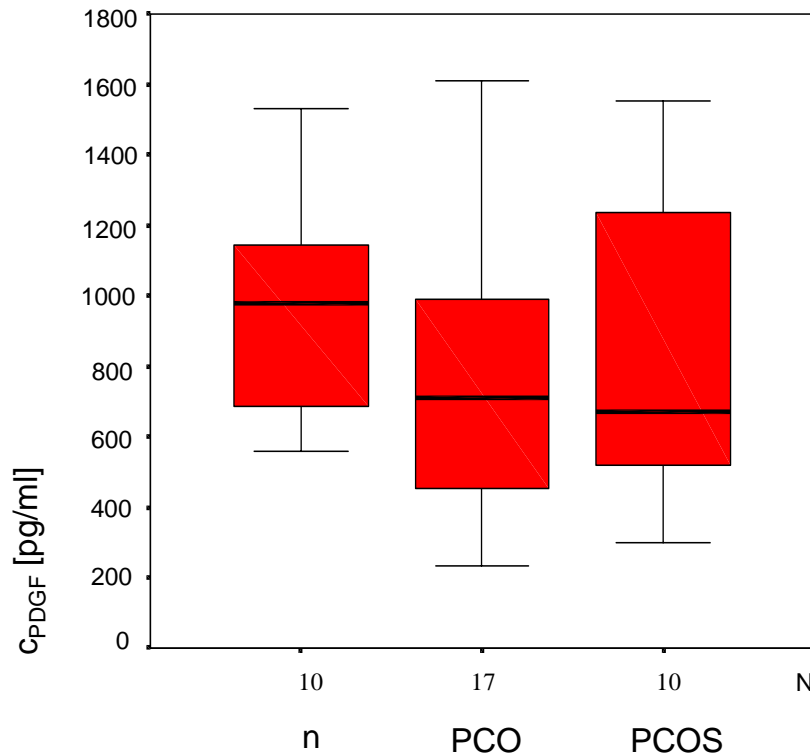


Diagramm 6: Serumkonzentrationen von PDGF-AB bezogen auf die Gruppen
Signifikanzen Gruppe n, PCO, PCOS $p > 0,05$, $n = PCO = PCOS$

Tabelle 19: Ausgewertete Fälle von EGF im Serum

Anzahl der ausgewerteten Seren für EGF N = 37					
EGF-Serum	Gruppe	gültig		nicht nachweisbar	
		N	Prozent %	N	Prozent %
EGF-Serum	n	10	100	0	0
	PCO	17	100	0	0
	PCOS	10	100	0	0

Im Serum waren alle 3 Gruppen positiv auf EGF getestet worden (Tab.19). In der Gruppe der sterilen Frauen mit unauffälliger Anamnese ergab sich in Bezug auf die Konzentrationen von EGF ein Median von 274,8 pg/ml, ein Minimalwert von 73,1 pg/ml und ein Maximalwert von 670,7 pg/ml. In der Gruppe der Frauen mit PCO betrug der Median 268,3 pg/ml, der Minimalwert 50,9 pg/ml und der Maximalwert 670,7 pg/ml. Für die Probandinnen mit PCOS wurde ein Median von 338,9 pg/ml, ein Minimum von 103,5 pg/ml und ein Maximum von 531,8 pg/ml ermittelt.

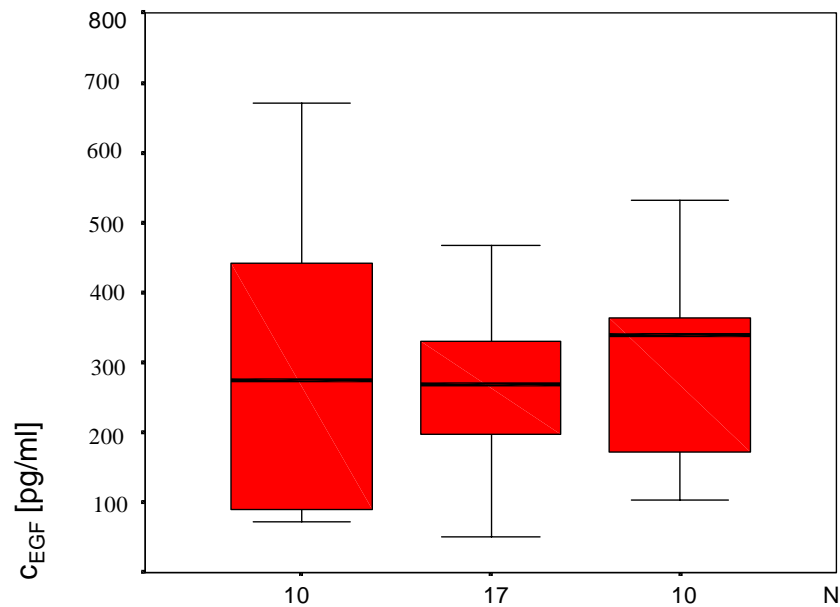


Diagramm 7: Serumkonzentrationen von EGF bezogen auf die Gruppen, Signifikanzen Gruppe n, PCO, PCOS $p > 0,05$; $n = PCO = PCOS$

Tabelle 20: Verarbeitete Fälle von bFGF im Serum

Anzahl der ausgewerteten Seren für FGF N = 37					
		Gültig		nicht nachweisbar	
	Gruppe	N	Prozent %	N	Prozent %
bFGF Serum	n	5	50,0	5	50,0
	PCO	9	52,9	8	47,1
	PCOS	8	80,0	2	20,0

In der Gruppe der sterilen Frauen mit unauffälliger Anamnese enthielten 5 der 10 Seren bFGF. Es ergab sich für die Konzentrationen von bFGF im Serum ein Median von 5,0 pg/ml, ein Minimalwert von 1,25 pg/ml und ein Maximalwert von 8,0 pg/ml. In der Gruppe der Frauen mit PCO gelang der Nachweis in 9 Seren. Es ließ sich eine Median von 4,63 pg/ml, ein Minimalwert von 2,0 pg/ml und ein Maximalwert von 26,8 pg/ml ermitteln. Bei den Frauen mit PCOS waren 8 von 10 Proben auf bFGF positiv getestet worden. Der Median lag bei 7,0 pg/ml, das Minimum bei 2,0 pg/ml und das Maximum bei 23,0 pg/ml.

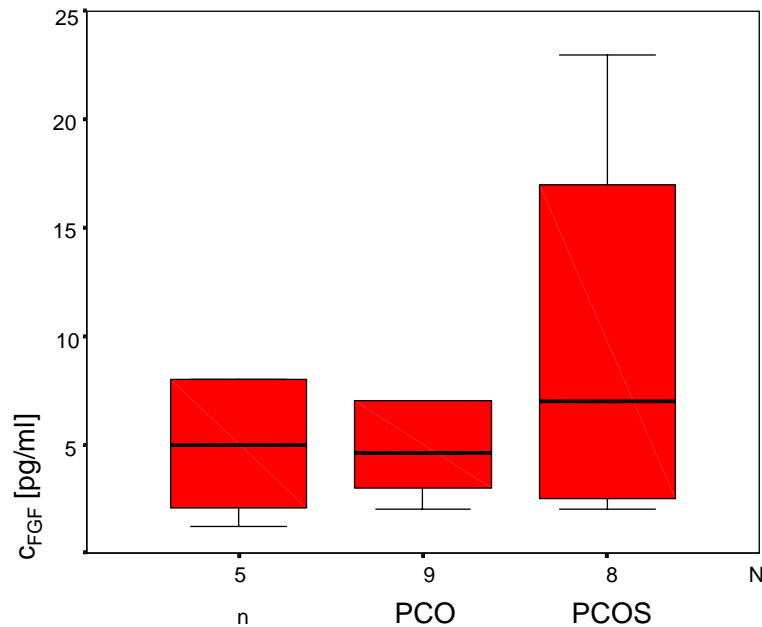


Diagramm 8: Serumkonzentration von bFGF in den jeweiligen Gruppen, Signifikanzen Gruppe n, PCO, PCOS $p > 0,05$; $n = PCO = PCOS$

5.3.2 Vergleich der Follikelflüssigkeiten zwischen den Gruppen n, PCO und PCOS

5.3.2.1 PDGF-AB

In der Gruppe infertiler Frauen mit normalem Zyklus wurden für PDGF-AB keine Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze gemessen (Tab. 21).

In der Gruppe mit PCO-Patientinnen waren bei fünf Proben die Konzentrationen für PDGF-AB oberhalb der Nachweisgrenze (Tab. 21). Die Messung ergab Werte von 8,8 pg/ml, 11,3 pg/ml, 13,8 pg/ml, 25,0 pg/ml, 58,9 pg/ml. Daraus errechnete sich ein Median von 13,8 pg/ml, ein Minimalwert von < 8,8 pg/ml und ein Höchstwert von 58,9 pg/ml.

Bei den Frauen mit PCOS gelang der Nachweis für PDGF-AB nur in 3 Fällen (Tab. 21). Aus den Konzentrationen 10,9 pg/ml, 11,0 pg/ml, 32,0 pg/ml ergab sich ein Median von 3,0 pg/ml, ein Minimum von 10,9 pg/ml und ein Maximum von 32,0 pg/ml.

Tabelle 21: Verarbeitete Fälle von PDGF-AB in der Follikelflüssigkeit

Anzahl der ausgewerteten Follikelflüssigkeiten für PDGF-AB N = 134					
		nachweisbar		nicht nachweisbar	
	Gruppe	N	Prozent %	N	Prozent %
PDGF-AB - Follikel	n	-	-	27	100
	PCO	5	7,8	59	92,2
	PCOS	3	7,0	40	93,0

Signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe n und den Frauen mit PCO und PCOS konnten, auch auf Grund der niedrigen Fallzahl nicht ermittelt werden ($p > 0,05$).

5.3.2.2 EGF

In der Gruppe der sterilen Frauen mit unauffälliger Anamnese konnte EGF in 25,9 % der Fälle nachgewiesen werden (Tab. 22). Rechnerisch ergab sich ein Median von 7 pg/ml, ein Minimalwert von 0,8 pg/ml und ein Maximalwert von 2,0 pg/ml.

Für die Probandinnen mit PCO konnte EGF zu 23,4 % in der Follikelflüssigkeit gefunden werden (Tab. 22). Daraus leitete sich ein Median von 2,2 pg/ml, ein Minimalwert von 0,9 pg/ml und ein Maximalwert von 20 pg/ml ab.

Für die Probandinnen mit PCOS ließ sich der Nachweis von EGF zu 39,5 % führen (Tab. 22) und ein Median von 2,0 pg/ml, ein Minimum von 0,8 pg/ml und ein Maximum 5,7 pg/ml ermitteln.

Tabelle 22: Nachgewiesene Konzentration an EGF im Follikel in Bezug auf die Gruppen

Anzahl der ausgewerteten Follikelflüssigkeiten für EGF N = 134					
		Gültig		Nicht nachweisbar	
	Gruppe	N	Prozent %	N	Prozent %
EGF-Follikel	n	7	25,9	20	74,1
	PCO	15	23,4	49	76,6
	PCOS	17	39,5	26	60,5

Es wurden signifikante Unterschiede in den Konzentrationen zwischen den Gruppen deutlich. In den Follikelflüssigkeiten der Frauen mit PCO und PCOS lagen die Konzentrationen von EGF höher als in den Proben der infertilen Frauen mit

normalem Zyklus. Die Signifikanz betrug zwischen Gruppe n und PCO $p = 0,031$ ($p < 0,05$) und zwischen Gruppe n und PCOS $p = 0,051$ ($p \sim 0,05$). Die Frauen mit PCO und PCOS sind bei einer Signifikanz von 0,791 hinsichtlich ihrer Konzentrationen nicht zu unterscheiden (Diagramm 9).

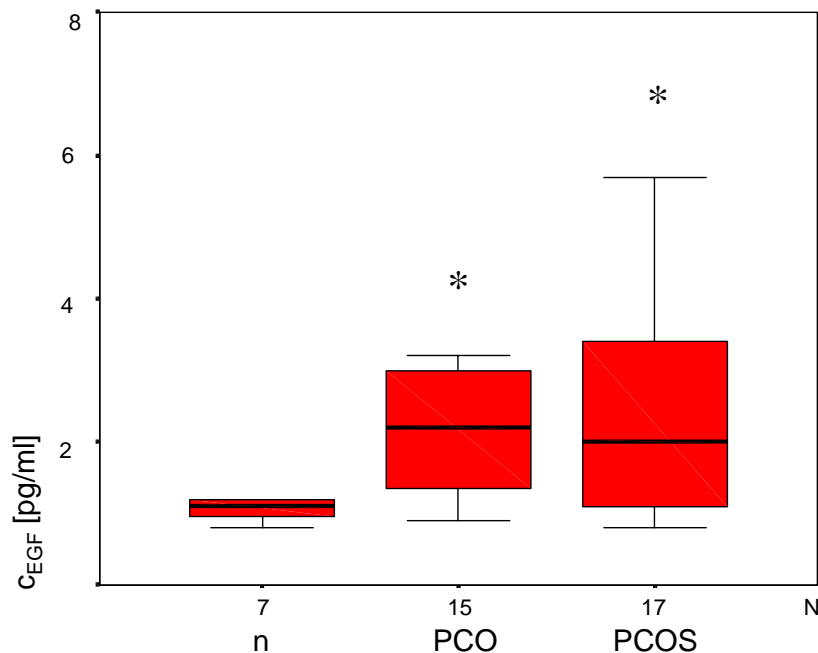


Diagramm 9: Konzentrationen von EGF im Follikel Signifikanz Gruppe n und Gruppe PCO $p < 0,05$; Signifikanz Gruppe n und Gruppe PCOS $p < 0,05$; $n < PCO$, $PCOS$, $PCO = PCOS$

5.3.2.3 bFGF

bFGF konnte in der Gruppe steriler Frauen mit unauffälliger Anamnese in 92,6 % der Fälle nachgewiesen werden (Tab. 23). Daraus errechnete sich ein Median von 40pg/ml, ein Minimalwert von 2,8 pg/ml und ein Maximalwert von 176,0 pg/ml.

In der Gruppe der Frauen mit PCO konnte bFGF in 100 % der untersuchten Follikelflüssigkeiten nachgewiesen werden (Tab. 23). Der Median betrug 89,12 pg/ml, der Minimalwert 10 pg/ml und der Maximalwert 442,1 pg/ml.

Bei den Frauen mit PCOS konnte bFGF in 93 % ermittelt werden (Tab. 23), woraus sich ein Median von 82,93 pg/ml, ein Minimum von 10 pg/ml und ein Maximum von 546,0 pg/ml ergab.

Tabelle 23: Nachgewiesene Konzentration an bFGF im Follikel in Bezug auf die Gruppen

Anzahl der ausgewerteten Follikelflüssigkeiten für bFGF N =1 34					
Gruppe	N	gültig		nicht nachweisbar	
		Prozent %		N	Prozent %
n	25	92,6		2	7,4
bFGF- Follikel PCO	64	100		0	0
PCOS	40	93,0		3	7

Die Konzentrationen für FGF sind bei den Frauen der Gruppe n signifikant niedriger als die der Frauen mit PCO. Zwischen den beiden Gruppen besteht eine Signifikanz von $p = 0,030$. Ein Konzentrationsunterschied zwischen der Gruppe der Frauen mit normalem Zyklus und denen mit polyzystischem Ovar Syndrom deutet sich bei einer Signifikanz von $p = 0,059$ an. Wobei auch hier die Gruppe mit PCOS höhere Werte für bFGF beinhaltet. Die Konzentrationen von Patientinnen mit PCO und PCOS unterscheiden sich nicht ($p > 0,05$) (Diagramm 10).

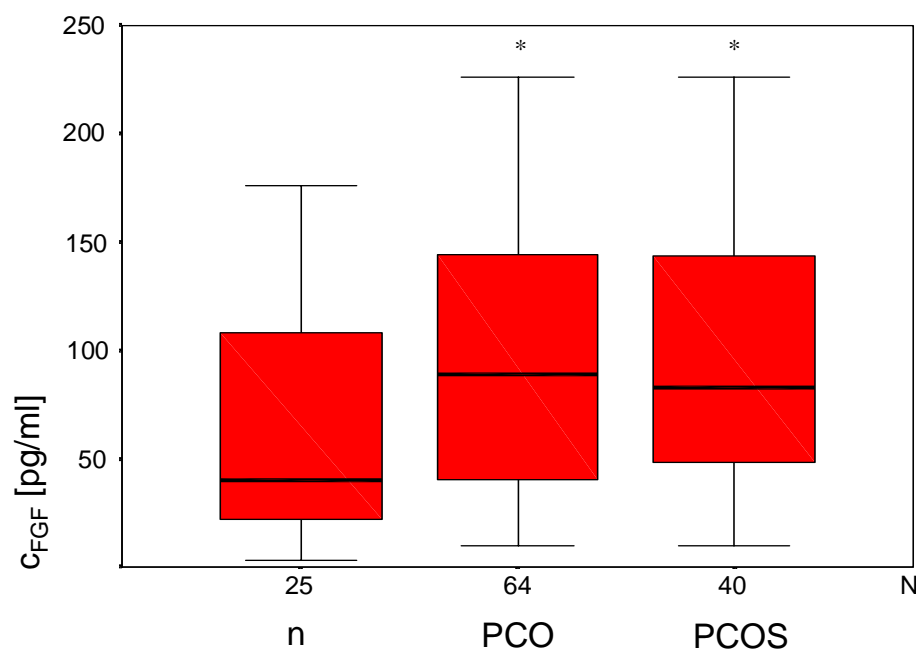


Diagramm 10: Konzentrationen von bFGF im Follikel bezogen auf die Gruppen

Signifikanz Gruppe n und Gruppe PCO $p < 0,05$ Signifikanz Gruppe n und Gruppe PCOS $p < 0,059$

5.3.3 Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Wachstumsfaktoren und Serumhormonen bzw. zum BMI der Probandinnen

In dieser Arbeit konnten keine signifikanten Ergebnisse bei der Untersuchung einer Abhängigkeit zwischen den Konzentrationen der Wachstumsfaktoren im Serum und den ausgewählten Serumhormonen in der Regressionsanalyse auch in Bezug auf die einzelnen Gruppen ermittelt werden. Auch der BMI konnte in keine Beziehung mit den Konzentrationen der Wachstumsfaktoren gesetzt werden. Die ausgewerteten Serumhormone und die durch das Institut für Klinische Chemie der FSU Jena ermittelten Konzentrationen sind in der Tabelle 24 zusammengestellt.

Tabelle 24: Verarbeitete Fallzahlen und Charakterisierung der Serumhormone hinsichtlich der Konzentration

Serum	gültig	nicht gemessen	Median	Minimum	Maximum
E2 pmol/l	34	3	4069,5	408	13918
FSH mIU/ml	32	5	5,85	0,2	15,2
Progesteron nmol/l	34	3	22,85	4,2	146,9
freies Testosteron pmol/l	30	7	7,32	1,39	22,10
Androstendion nmol/l	33	4	16,7	2,7	46,3
DHEAS µmol/l	34	3	6,0	1,2	13,6
SHBG nmol/l	33	4	123,0	8,6	500

5.3.4 Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Wachstumsfaktoren und Hormonen des Follikels

Bei dieser Untersuchung ergab sich keine Korrelation zwischen den Wachstumsfaktoren in der Follikelflüssigkeit und den enthaltenen Hormonen. Ein Einfluss des Follikelvolumens auf die Konzentration der Wachstumsfaktoren in der Follikelflüssigkeit wurde nicht deutlich. Auch die Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen den Wachstumsfaktoren der Gruppen und E2, Progesteron, DHEAS, SHBG, freies Testosteron und Androstendion erbrachte kein charakterisierendes Ergebnis.

Ein Zusammenhang zwischen Konzentration der Wachstumsfaktoren im Follikel und dem am Entnahmetag gemessenen Follikelvolumen konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Die verarbeiteten Fallzahlen und Konzentrationen der Follikelhormone sowie der Follikelvolumina sind in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Ausgewertete Anzahl und Charakterisierung der Follikelhormone sowie der Follikelvolumina

Follikel	gültig	nicht gemessen	Median	Minimum	Maximum
E2 pmol/l	130	4	1370698,5	2825	6862400
Progesteron nmol/l freies	130	4	20000,0	188	159900
Testosteron pmol/l	130	4	255,76	1,35	1440,00
Androstendion nmol/l	130	4	84,4	0,58	677,60
DHEAS µmol/l	130	4	7,0	0,1	21,2
SHBG nmol/l	129	5	178	18,0	1000,0
Volumen ml	122	12	4,3	1,7	19,5

5.3.5 Untersuchung eines Zusammenhangs zwischen den Wachstumsfaktoren im Blut und in der Follikelflüssigkeit

Ergänzend zu den aufgeführten Ergebnissen war die Frage nach einer Korrelation der Konzentration der Wachstumsfaktoren im Serum mit der Konzentration in der Follikelflüssigkeit zu beantworten. In der Regressionsanalyse sind keine statistisch verwertbaren Korrelationen zwischen den Parametern im Blut und in den Follikelflüssigkeiten gefunden worden. Es ergaben sich damit keine Hinweise auf einen Zusammenhang, so dass auf Abbildungen verzichtet wurde.

6 Diskussion

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis und der Vergleich der Wachstumsfaktoren EGF, bFGF und PDGF-AB in Follikelflüssigkeiten und in den entsprechenden Seren von sterilen Frauen mit unterschiedlichen endokrinologischen Auffälligkeiten.

6.1 Nachweis der Wachstumsfaktoren PDGF-AB, EGF und bFGF im Serum

In dieser Untersuchung gelang der Nachweis von PDGF-AB und EGF im Serum (N = 37) in 100 % der Fälle.

Von allen drei Faktoren sind Wirkungen an anderen Organsystemen bekannt. Abe gelang mittels ELISA der Nachweis von humanem EGF im Serum mit einer hohen Spezifität (Abe, Sagawa., et al. 1987). Nexo wies EGF im humanen Serum und Urin mittels ELISA nach (Nexo, Jorgensen et al., 1992). Er stellte dabei höhere Konzentrationen bei den Frauen als bei den Männern fest. Im Plasma wurde kein EGF gefunden.

PDGF wird von Endothelzellen, Makrophagen und Thrombozyten freigegeben. Er ist bekannt als mitogen wirkender Serumfaktor und wirkt in Kultur in Muskelgewebe und Gliazellen fördernd auf die Zellteilung (Dirks & Bloemers, 1995).

bFGF war in 73 % (N = 27) der Serumproben enthalten. Die höchsten Konzentrationen im Serum waren dem PDGF zuzuordnen (232,2 - 1610,9 pg/ml). EGF wurde mit Konzentrationen von 50,9 - 670,7 pg/ml im Serum nachgewiesen. bFGF erreichte Konzentrationen von 0,1 - 26,8 pg/ml.

bFGF ist ein im Organismus häufig vorkommender Faktor. Sein Nachweis gelang z. B. in Neuronen, Auge, Knorpel oder Leber (Klagsbrun, 1989) und ist ebenfalls bei der Wundheilung beteiligt. Der Nachweis der Faktoren im peripheren Blut ist somit erklärbar.

6.2 Nachweis von EGF in der Follikelflüssigkeit

Über das Vorkommen von EGF in der Follikelflüssigkeit von präovulatorischen Follikeln liegen vielfältige Untersuchungen vor.

In 29 % der Follikelflüssigkeiten gelang in dieser Arbeit der Nachweis von EGF. Die Konzentrationen lagen zwischen 0,8 pg/ml und 20 pg/ml. In 71 % der Follikelflüssigkeiten war EGF nicht vorhanden.

Hammadeh bestimmte mittels ELISA die Konzentration von EGF in der Follikelflüssigkeit präovulatorischer Follikel von Patientinnen im Rahmen einer ICSI-Behandlung um die Ergebnisse mit den unterschiedlichen Stimulationsprotokollen (hMG, FSH, FSH/hMG) in Beziehung zu setzen. Dabei konnte EGF in allen untersuchten Follikelflüssigkeiten nachgewiesen werden, wie in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Konzentrationen von EGF in der Follikelflüssigkeit

	HMG (n = 38)	FSH (n = 18)	FSH/hMG (n = 29)
EGF pg/ml	9,46 ± 5,77	8,88 ± 6,35	8,27 ± 3,75

In einer anderen Arbeit wurde ebenfalls EGF in Follikelflüssigkeiten von high- und low-Respondern im Rahmen der ICSI-Behandlung untersucht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ergab sich nicht. Die gemessenen Konzentrationen sind in Tabelle 27 aufgeführt (Hammadeh, Fischer-Hammadeh et al., 2003).

Tabelle 27: Konzentrationen von EGF in der Follikelflüssigkeit

	low responder (n = 49)	high responder (n = 34)
EGF pg/ml	9,12 ± 5,5	8,97 ± 5,5

Arbeiten von McWilliam (McWilliam, Leake et al., 1995 und Reeka und Berg (Reeka, Berg et al., 1998) sowie Ozornek (Ozornek, Bielfeld et al., 1999) konnten EGF mittels ELISA in unterschiedlichen Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit nachweisen.

In den von McWilliam im Rahmen eines IVF-Programms untersuchten Follikelflüssigkeiten mittels ELISA konnte in 1 von 52 Follikeln EGF nachgewiesen (20 pg/ml) werden (McWilliam, Leake et al., 1995). Die Sensitivität des verwendeten Tests betrug 3,9 pg/ml und lag dabei über der Sensitivität des in der vorliegenden Arbeit genutzten Kits (0,7 pg/ml).

Reeka und Berg (Reeka, Berg et al., 1998) untersuchten am Tag der Oozytenaspiration gewonnene Follikelflüssigkeiten von 54 IVF-Patienten mittels eines ELISA Tests. In allen Follikelflüssigkeiten wurden keine messbaren Konzentrationen an EGF im Assay gefunden. Die Sensitivität des verwendeten Tests ist mit 10 pg/ml angegeben. Genaue Angaben über den Reifegrad der verwendeten Follikel fehlen.

Ozornek konnte mittels ELISA in präovulatorischen Follikeln EGF nachweisen. Dabei wurden signifikant niedrigere EGF-Konzentrationen bei den Frauen gefunden, die eine Schwangerschaft erreichten, im Vergleich zu den Frauen ohne Schwangerschaft (Ozornek, Bielfeld et al., 1999).

EGF wurde in präovulatorischen Follikeln von Westergaard und Yding Andersen (Westergaard & Andersen, 1989) in einer Konzentration von 0,6 bis 2,4 ng/ml in der Follikelflüssigkeit mittels Radioimmunassay gemessen. Die obere Nachweisgrenze des Tests lag bei 5 ng/ml. Eine weitere Arbeit der beiden Autoren untersuchte auf die gleiche Weise Follikelflüssigkeiten antraler Follikel. Dabei war die Konzentration an EGF im Serum signifikant niedriger als im Follikel (Westergaard, Yding et al., 1990).

Artini (Artini, Battaglia et al., 1994) wies EGF im RIA mit einer Sensitivität von 5 pg/ml in einer Konzentration von 4 ng/ml in Follikelflüssigkeiten von gereiften und atretischen Oozyten nach.

Der immunhistochemische Nachweis von EGF in post mortem gewonnenem präovulatorischen Follikeln von fertilen Frauen gelang in Theka- und Granulosazellen in der Arbeit von Reeka und Berg. In dem Oozyt sowie im Stromagewebe blieb der Nachweis von EGF aus (Reeka, Berg et al., 1998).

Maruo und Ladines-Llave (Maruo, Ladines-Llave et al., 1993) sowie von Budnik (Budnik & Mukhopadhyay, 1996) führten den immunhistochemischen Nachweis von EGF und seinem Rezeptor in den Theka- und Granulosazellen präovulatorischer Follikel.

Weder EGF noch seine mRNA konnte Tamura (Tamura, Sasano et al., 1995) in den Follikeln und Corpora lutea von 51 prämenopausalen Frauen mit normalem Zyklus immunhistochemisch nachweisen.

Wei konnte immunhistochemisch kein EGF im Ovar, wohl aber EGFR in den Granulosazellen nachweisen. Die Nachweise von EGF im Serum sowie in der Follikelflüssigkeit waren positiv. Dabei stiegen die Konzentrationen im Serum mit der Entwicklungsstufe der Follikel an (Wei, Zhang et al., 1997).

Die Ursache für das zum Teil starke Differieren der in den einzelnen Studien gemessenen Konzentrationen an EGF in präovulatorischen Follikeln ist nicht klar. Möglicherweise liegt es an der Verwendung unterschiedlicher Tests und an den abweichenden Sensitivitäten der Kits. Das Radioimmunassay ist eine empfindlichere Messmethode bei der Bestimmung von EGF in der Follikelflüssigkeit. Mit der Vereinheitlichung der Messmethode könnte eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse erreicht werden und dadurch die Bewertung und Einordnung der Ergebnisse verbessert werden.

6.3 EGF und seine Wechselwirkung mit den ovariellen Steroiden

In Studien werden zum Einfluss des EGF auf die Steroidsynthese unterschiedliche Beobachtungen gemacht. So gibt es keine einheitliche Meinung über die Wirkung von EGF auf die Progesteronsekretion *in vitro*.

Westergaard und Yding Andersen (Westergaard & Andersen, 1989) konnten die in der Follikelflüssigkeit gemessenen Konzentrationen an EGF in keinen Zusammenhang mit den Konzentrationen an Progesteron bzw. Östrogenen bringen. Verschiedene Studien geben Hinweise auf einen auto- bzw. parakrinen Einfluss des EGF auf die Steroidgenese (Hsueh & Jones, 1981), (Mondschein & Schomberg, 1981a), (Knecht & Catt, 1983). Richardson (Richardson, Gadd et al., 1989) unterstützt diese Aussage. Er kam zu dem Schluss, dass die Behandlung von humanen Granulosazellen mit EGF *in vitro* zu einer Steigerung der Progesteron- und Östrogensynthese führt, jedoch nicht zu einer Steigerung der Zellzahl und vermutet dabei eine parakrine Rolle des EGF. Dieser positive Effekt auf die Steroide wird von Gaetje (Gaejtje, 1994) bestätigt.

Angervo (Angervo, Koistinen et al., 1992) wies dem EGF nur einen leichten stimulatorischen Effekt auf die Progesteronsynthese nach. Serta berichtete 1993, dass eine frühe und kontinuierliche Behandlung der Granulosazellen mit EGF zu einer maximalen Progesteronsynthese führt (Serta & Seibel, 1993). Yap konnte *in vitro* keinen signifikanten Stimulationseffekt von EGF auf die Progesteronsekretion feststellen (Yap, Chandrasekher et al., 1998).

Der von Volpe und Artini untersuchte Effekt von HGH auf EGF und Androstendion konnte von Volpe und Artini *in vitro* nicht nachgewiesen werden. Die Behandlung von HGH führte zu einer Abnahme der Konzentration von Androstendion in der Follikelflüssigkeit. Die Konzentration von EGF blieb nach der Behandlung mit HGH unverändert (Volpe & Artini, 1992).

Dies steht im Gegensatz zu der Beobachtung von Buck und Schomberg, die im Tierversuch mehr EGF-Rezeptoren in den kleinen Follikeln fanden. Verantwortlich für diese unterschiedlichen Ergebnisse ist wahrscheinlich die Vorbehandlung der Frauen mit HCG, durch die sich der Follikel in der Luteinisierungsphase befindet und weitgehend ausdifferenziert ist und die Sensibilität gegenüber EGF einbüßt (Buck & Schomberg 1988).

Der in dieser Arbeit ebenfalls untersuchte Zusammenhang zwischen den Serumhormonen und den EGF-Konzentrationen im Serum erbrachte keine signifikante Abhängigkeit.

McWilliam wies in seiner Arbeit eine positive Korrelation von EGF im Serum und Follikel nach. (McWilliam, Leake et al., 1995). Die Gegenüberstellung von EGF und den Hormonen in der Follikelflüssigkeit ergab jedoch keine signifikante Abhängigkeit (McWilliam, Leake et al., 1995).

Der in dieser Arbeit geführte Nachweis von EGF in der Follikelflüssigkeit im Vergleich zu den hier genannten Studienergebnissen, lässt eine regulierende Rolle des EGF auf die unterschiedlichen Stadien des Follikels vermuten, so auch auf das präovulatorische Stadium. Laut Meinung einiger Autoren, scheint EGF dabei besonders auf die frühe Entwicklungsphase des Follikels Einfluss zu nehmen und beeinflusst möglicherweise die Rekrutierung des Primordialfollikels und seine

weitere Reifung. Auch eine Mitbeteiligung bei der Entstehung von atretischen Follikeln kann diskutiert werden.

6.4 Zusammenhang zwischen der EGF-Konzentration im Follikel und Follikelvolumen

Ein Zusammenhang zwischen der EGF-Konzentration und dem Follikelvolumen konnte in unserer Arbeit nicht gefunden werden. Auch Artini konnte keine signifikante Korrelation zwischen EGF und dem Follikelvolumen herstellen (Artini, Battaglia et al., 1994).

Bei Westergaard und Yding Anderson (Westergaard & Andersen, 1989) hingegen korrelierten EGF und Follikelgröße entgegengesetzt zueinander (Westergaard & Andersen, 1989).

Hurst zeigte eine Abhängigkeit zwischen der Follikelgröße und dem Effekt von EGF an der Granulosazelle *in vitro* (Hurst, Zacur et al., 1993). Mit steigender Follikelgröße fällt die Östrogensekretion, die als abhängiger Parameter der Aromatasefunktion gilt, ab.

6.5 Die Rolle des EGF beim PCO/PCOS

Der Vergleich der Konzentrationen von EGF bezüglich der Gruppen PCO und PCOS erbrachte im Vergleich zu den Probandinnen mit normalem Zyklus erhöhte Werte für EGF.

In einer früheren Arbeit (Stewart, Owens et al., 1992) wurde DNS von EGF in normalen und gutartigen Ovarialtumoren bestimmt. EGF war in Konzentrationen von 0,03 - 0,533 ng/mg DNS in 12,7 % der Fälle in normalen Ovarien nachweisbar. In den gutartig veränderten Ovarien war EGF in Konzentrationen von 0,1225 - 2,08 ng/ml DNS bei 31,8 % zu finden.

Die von Eden (Eden, Jones et al., 1990) analysierte Follikelflüssigkeit von Frauen mit PCOS unterschied sich dabei nicht von der in unauffälligen Ovarien gemessenen EGF-Konzentration. (< 1 ng/ml).

In einer Studie von Franks und Mason war eine Steigerung der FSH- Konzentration im Serum von der frühen bis mittleren Phase der Follikelreifung bei anovulatorischen Frauen mit PCOS im Vergleich zu normalen Ovarien nicht beweisend für eine erfolgreiche Follikelreifung. Weiterführend wurden in dieser Studie in den Follikelflüssigkeiten von Frauen mit PCO signifikant höhere Konzentrationen von EGF als in der Gruppe der gesunden Frauen gemessen. Die höchsten Konzentrationen an EGF waren den kleinen Follikeln der PCO-Patientinnen zuzuordnen. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass es unter dem endogenen FSH zu einer Abnahme der Bioaktivität kommt oder, dass die Schwelle für die Follikelreife angehoben wird (Franks, Mason et al., 1988).

Ergänzend wurde in der weiteren Studie von Mason und Margara (Mason, Margara et al., 1990) der Effekt von EGF auf Granulosazellen von spontan ovulierenden Frauen mit unauffälligem Ovar und Frauen mit Spontanovulation und polyzystisch verändertem Ovar *in vitro* untersucht. Dabei wurde der inhibitorische Effekt von EGF auf die FSH induzierte Östrogensynthese auf normalem und polyzystisch verändertem Ovar gezeigt. Jedoch stellte sich heraus, dass die Dosis von EGF, bei maximaler und submaximaler FSH Dosis, um eine 50 %ige Inhibition von Östrogen zu erreichen 5-10fach höher liegt. Mason macht dafür eine geringe Aromataseaktivität der Granulosazellen der Frauen mit PCO verantwortlich.

Erickson (Erickson, Magoffin et al., 1992) untersuchte die Follikelflüssigkeit und Granulosazellen *in vitro* von Frauen mit PCOS, die sich auf Grund eines Endometriumkarzinoms einer totalen Hysterektomie und Salpingoophorektomie unterziehen mussten, im Vergleich zu Frauen, denen das Ovar wegen eines Ovarialtumors entfernt wurde. In der Follikelflüssigkeit der Patienten mit PCO wurden messbare Mengen an FSH nachgewiesen und die Ratio von Androstendion/Östradiol und Progesteron/Östradiol war sehr hoch. Im Gegensatz dazu war in der Flüssigkeit der normalen Frauen kein FSH messbar, und die Ratio näherte sich dem Wert 1. Es wurden Mengen an FSH gemessen, die 10 mal höher sind als man für die Induktion der Cytochrom-P450- Aromatase benötigt, trotzdem war die Konzentration an Östradiol 10fach niedriger als normal. Diese Beobachtung führt zu der Annahme, dass die Follikelflüssigkeit inhibierende Moleküle enthält, die hemmend auf das FSH einwirken. (Franks, Mason et al., 1988), (Steinkampf, Mendelson et al., 1988).

Dass sich in der Follikelflüssigkeit Inhibitoren, wie EGF befinden, die FSH hemmen und die im Versuch *in vitro* nicht vorhanden sind, vermutet auch Volpe (Volpe, Coukos et al., 1991). In der zugrunde liegenden Arbeit wurde die Follikelflüssigkeit von Frauen mit PCOS und infertilen Frauen mit normalem Zyklus, die im Rahmen eines IVF-Programms betreut wurden, mittels Radioimmunassay analysiert. Die Gruppe der Frauen mit PCOS wies signifikant höhere Konzentrationen an EGF sowie Testosteron im Vergleich zur Gruppe mit normalen Frauen auf. Die Menge an Östrogenen in der Follikelflüssigkeit zeigte hingegen keinen signifikanten Unterschied. Die Behandlung von kultivierten Granulosazellen mit FSH ergab bei beiden Gruppen eine Steigerung der Östrogenproduktion und einen Rückgang der Östrogenmenge in Abwesenheit von FSH und zeigte bei beiden Patientengruppen die gleiche Sensibilität gegenüber FSH. Homburg (Homburg & Amsterdam, 1998) fasst die Akkumulation kleiner antraler Follikel als Folge der Dysregulation apoptotischer Gene, die zu einer Überexpression von EGF führen, zusammen und ordnet dem EGF die Funktion des Blockens der Apoptose zu.

EGF hat verschiedene Effekte an der Granulosazelle gezeigt. EGF ist in der Lage, einen stimulativen als auch inhibierenden Effekt auf die Granulosazelle auszuüben. Des Weiteren hat EGF einen proliferativen Effekt auf Granulosazellen in Kultur beim Menschen und im Tierversuch (Gospodarowicz & Bialecki, 1979), (Bendell & Dorrington, 1990), (Rodriguez, Berchuck et al., 1991), (Wandji, Srsen et al., 1996). EGF inhibiert die durch FSH-stimulierte Aromataseaktivität und die LH-Rezeptor-Induktion (Budnik & Mukhopadhyay, 1996). Dies führt zu einer Reduktion der Östrogensynthese. Gleichzeitig steigert EGF die FSH-Rezeptor-Expression und die FSH-induzierte Progesteronproduktion, welche die Luteinisierungsphase einleitet (Maruo, Ladines-Llave, et al. 1993). EGF ist an der Reifung der Oozyten beteiligt. Zusammen mit der Inhibin/Aktivin-Familie stimuliert EGF die Kernreifung der Oozyten und fördert zudem die Zytoplasmareifung der Oozyten (Driancourt & Thuel, 1998). Ein hemmender Effekt des EGF auf die Apoptosis präantraler Follikel von Nagetieren wurde *in vitro* beschrieben (Eppig & O'Brien, 1996), (Wandji, Srsen et al., 1996).

6.6 Nachweis von bFGF in der Follikelflüssigkeit

In dieser Studie wurde bFGF in 93,3 % der untersuchten präovulatorischen Follikel nachgewiesen. Das Minimum betrug 2,8 pg/ml, das Maximum 546 pg/ml. Zudem waren im Follikel, im Vergleich zum Serum, höhere Konzentrationen zu finden.

Seli gelang der Nachweis von bFGF in der Follikelflüssigkeit von Frauen mit IVF und ET mittels ELISA (Seli, Zeyneloglu et al., 1998). Die Konzentrationen von bFGF im reifen Follikel reichten von 43 - 177 pg/ml. Konzentrationsschwankungen des bFGF in der Follikelflüssigkeit während der Follikulogenese waren nicht nachzuweisen (Seli, Zeyneloglu et al., 1998).

In einer prospektiven Studie von 2001 wurden von Malamitsi-Puchner und Mitarbeitern 42 Follikelflüssigkeiten von 4 gesunden Patientinnen mit unbekannter Sterilität und 2 Patientinnen mit tubar verursachter Sterilität nach erfolgter IVF-Behandlung mittels ELISA untersucht. bFGF wurde in allen Follikelflüssigkeiten nachgewiesen. Ein signifikanter Konzentrationsunterschied bezogen auf den Reifegrad der Oozyten und der Fertilisationsrate konnte nicht nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind aus der Tabelle 28 ersichtlich (Malamitsi-Puchner et al., 2001).

Tabelle 28: Konzentration von bFGF (Mean \pm SD) in der Follikelflüssigkeit

	Reife Oozyten	Unreife Oozyten
	Mean \pm SD	Mean \pm SD
bFGF pg/ml	53,8 \pm 6,2	54,5 \pm 5,1

In einer anderen Arbeit aus dem Jahre 2003 von Malamitsi-Puchner wurde erneut bFGF in Follikelflüssigkeiten von Patientinnen im Rahmen einer IVF-Behandlung nachgewiesen. Auch hier gelang der Nachweis einer Korrelation zwischen Reifegrad des Oozyten und Konzentration an bFGF nicht (Malamitsi-Puchner et al.; 2003).

Knee demonstrierte mit Hilfe der PMR das Vorkommen von bFGF und der mRNA in unfertilisierten humanen Oozyten (Knee & Pitcher, 1994).

Yamamoto (Yamamoto, Konishi et al., 1997) gelang der immunhistochemische Nachweis von bFGF im humanen Follikel. Die Granulosazellen waren vom Stadium des Primordialfollikels bis in die frühe Lutealphase für bFGF positiv. Die Granulosazellen von atretischen Follikeln waren nicht mitotisch aktiv und zeigten in der Studie eine Down-Regulation des bFGF. Die Thekazelle verhielt sich ab dem

präantralen Stadium positiv gegenüber dem bFGF und korrelierte mit der Proliferationsrate (Yamamoto, Konishi et al., 1997).

Watson (Watson, Anthony et al., 1992) konnte mit Hilfe der PMR bFGF RNA in humanen Granulosazellen darstellen. Aus der immer stärker werdenden Immunreaktion des FGF während der Follikulogenese und dem Rückgang der Immunreaktion am atretischen Follikel, nahm er eine mitogene Wirkung auf den Follikel an.

Gospodarowicz (Gospodarowicz, Ill et al., 1977) wies einen mitogenen Effekt des FGF auf die humane Granulosazelle *in vitro* nach, konnte diesen Effekt jedoch bei der Ratte nicht bestätigen. Auch eine Steigerung der DNS von Granulosazellen am Beispiel der Ratte konnte mittels FGF nicht erreicht werden. Jedoch zeigte sich ein stimulativer Effekt auf die Zelldifferenzierung (Adashi, Resnick et al., 1988).

Laut Reynolds und Redmer (Reynolds & Redmer, 1998) regte bFGF die bovine Lutealzelle in verschiedenen Stadien der Follikulogenese zur Proliferation an.

Andere Tierstudien haben gezeigt, dass bFGF mitogen auf die Granulosazellen *in vitro* wirkt und ihre Enddifferenzierung verzögert. bFGF verhindert den Eintritt der Granulosazelle in die G0-Phase. Da der ovarielle Follikel einer der am schnellsten proliferierenden Gewebe *in vivo* enthält, könnte bFGF eine Rolle bei der Initiierung der follikulären Morphogenese sein, indem er das Wachstum von Granulosazellen vor ihrem Eintritt in das präantrale Stadium, bei dem die Kontrolle durch Hormone einsetzt, kontrolliert (Gospodarowicz, 1989). Das Wechselspiel zwischen FGF und TGF- β könnte teilweise die entwicklungsbedingte Koordination verschiedener Gewebe in präantralen Follikeln erklären. Die Fähigkeit des FGF, als autokriner Wachstumsfaktor aktiv zu werden, wird womöglich vom TGF- β beeinflusst. TGF- β wird in den Thekazellen produziert und kann, abhängig von der Situation, die Aktivität des FGF positiv oder negativ modulieren (Gospodarowicz, 1989). In einer Studie mit Granulosazellen der Ratte wurde ein synergistischer Effekt von IGF-1 und bFGF herausgearbeitet (Kanzaki, Hattori et al., 1994).

Eine weitere Annäherung an die Wirkungsweise des bFGF kann über seine Bedeutung als angiogenetischer Faktor erfolgen. Dies ist besonders in der frühen Corpus-luteum-Phase von Bedeutung, in der angiogenetische Vorgänge eine

wichtige Rolle spielen. Diese Eigenschaft des FGF wurde durch verschiedene Autoren beschrieben (Folkman, Klagsbrun et al., 1988).

Ergebnisse früherer Tierstudien bekräftigen, dass dominante Follikel besser vaskularisiert sind und mehr Gonadotropine aus dem Blut aufnehmen (McNatty, 1981).

Stirling (Stirling, Waterman et al., 1991) zeigte, dass die Menge der Expression von mRNA des bFGF boviner Corpora lutea eng mit der angiogenetischen Aktivität verbunden ist. Die höchsten Level und die stärkste Lokalisation von FGFR-1 in bovinen Parenchymalutealzellen waren in der Mitte des Zyklus am höchsten und fielen dramatisch während der Lutealphase ab.

Im Gegensatz dazu war FGFR-1 in den lutealen Endothelzellen in allen Stadien des ovariellen Zyklus präsent. Besonders reichlich war FGFR-1 in den großen Mikrogefäßen (Kapillaren) im späten Stadium der Follikulogenese vorhanden (Doraiswamy, 1995).

Das Vorhandensein von FGF in den Lutealzellen und in den Granulosazellen korreliert mit der Vaskularisation des Corpus luteum der Ratte (Zheng, Redmer, et al. 1993). Allerdings haben sich über diese Behauptung Zweifel angemeldet, da das Signalpeptid für die aktive Sekretion durch die Zellmembran fehlt (Watson, Anthony et al., 1992), (Folkman, Klagsbrun et al., 1988).

Die von einigen Autoren beschriebene Rolle des FGF bei der Verhinderung des Zelltods (Tilly & Johnson, 1990) könnte eine Erklärung für die hohe Präsenz von FGFR-1 in den endothelialen Kapillaren der Lutealzellschicht sein. Ausgehend von diesen Hypothesen könnte man das Vorkommen von bFGF in der Follikelflüssigkeit durch das Übertreten von bFGF aus den Kapillaren der Lutealzellen präovulatorischer Follikel erklären.

6.7 FGF in der Follikelflüssigkeit und seine Wechselwirkung mit den ovariellen Steroiden

Nach den Ergebnissen in dieser Arbeit korreliert bFGF nicht mit den in der Follikelflüssigkeit enthaltenen Hormonen oder dem Follikelvolumen. Eine

Untersuchung von Seli ergab ebenfalls keine Korrelationen zwischen FGF und E2 sowie Progesteron im Serum (Seli, Zeyneloglu et al., 1998).

Welchen Einfluss hat bFGF auf die Steroidgenese? Studien haben einen hemmenden Effekt von bFGF auf die FSH-vermittelte LH- Rezeptor-Expression und Progesteronsekretion von Schweinen und Ratten gezeigt (Piquette, LaPolt et al., 1991).

In einer weiteren Arbeit führte die Behandlung tierischer Thekazellen von Follikeln mit bFGF zu einer Reduktion der IGF-1-Bindungsstellen an der Thekazelle. bFGF schwächte zudem die Antwort der Thekazelle auf IGF ab und verminderte indirekt die Androstendion- und Progesteronsynthese (Spicer, Alpizar et al., 1994).

Hingegen führt nach Meinung einiger Autoren bFGF zu einer verstärkten Expression des LH-Rezeptors der Ratte und somit zu einer vermehrten Progesteronsynthese (Kanzaki, Hattori et al., 1994).

Scaramuzzi (Scaramuzzi & Downing, 1995) untersuchte den Effekt von bFGF auf das Ovar am Schaf *in vivo*. bFGF supprimierte die Östradiol- und Androstendion-Sekretion und hatte keinen Einfluss auf die Progesteronsekretion oder die pulsatile LH-Sekretion. Die FSH-Konzentration stieg während der Behandlung mit bFGF stetig an, fiel aber nach der Behandlung wieder ab. Aber auch eine bimodale Funktion des FGF wird diskutiert. Analysen über den Einfluss des bFGF auf die FSH-vermittelte Progesteronsynthese ergaben einen induzierenden Effekt bei niedrigen Dosen von FSH und einen inhibierenden Effekt des FGF bei hohen Dosen von FSH (Baird & Hsueh, 1986).

Durch Hurwitz (Hurwitz, Hernandez et al., 1990) wurde eine hemmende Wirkung des bFGF auf die 17-alpha-Hydroxylase mittels radiomarkierten Pregnanolon herausgearbeitet. Es ist nach diesen Ergebnissen eine inhibierende Wirkung des bFGF auf die Östrogensynthese zum einen durch die Reduktion des Substratvorrates und zum anderen durch eine Schwächung der Aromataseaktivität festzustellen.

In Übereinstimmung mit dem Ergebnis von Hurwitz (Hurwitz, Hernandez et al., 1990) demonstrierte McAllister (McAllister, Byrd et al., 1994) an humanen Theka,-

Granulosa- und Luteinzellen *in vitro* eine inhibierende Wirkung des bFGF auf die 17-alpha-Hydroxylase-Expression. Andererseits verstärkt bFGF die cAMP-stimulierte 3-beta-Hydroxysteroiddehydrogenase.

In Zusammenschau aller hier aufgeführten Ergebnisse erfüllt bFGF verschiedene Funktionen als auto- und parakriner Faktor am Ovar und ist eng mit der Follikulogenese verbunden.

6.8 Die Rolle des bFGF beim PCO/ PCOS

In der vorliegenden Arbeit stellten sich zwischen den Konzentrationen des bFGF der sterilen Frauen mit ovulatorischem Zyklus und den Frauen mit PCO bzw. PCOS Unterschiede heraus. Demnach haben die Patientinnen der beiden zuletzt genannten Gruppen höhere Konzentrationen an bFGF in der Follikelflüssigkeit.

Hamaddeh untersuchte die Follikelflüssigkeit und das Serum auf bFGF mittels ELISA von PCO-Patientinnen, Frauen mit Endometriose und tubarer bzw. androgen bedingter Sterilität mit dem Ziel, die Ergebnisse mit dem Erfolg der ICSI in Beziehung zu setzen. Es ergaben sich insgesamt signifikant höhere Konzentrationen an bFGF in der Follikelflüssigkeit ($4,8 \pm 2,3\text{pg/ml}$) im Vergleich zum Serum ($104 \pm 39,0\text{pg/ml}$). Die erfassten Konzentrationen sind in Tabelle 29 zusammengefasst. Für Hamaddeh ergab sich weiterhin ein höher konzentriertes FGF im Serum in der Gruppe der tubar bedingten Sterilität als in der PCO-Gruppe sowie höhere Werte an FGF in der Gruppe der männlich bedingten Sterilität im Vergleich zu den Patientinnen mit PCO. Bei der vorliegenden Standardabweichung der Messwerte für FGF ist jedoch die Signifikanz der Ergebnisse kritisch zu betrachten. Die Konzentration von bFGF im Follikel unterschied sich in Bezug auf die Gruppen nicht signifikant. Er unterstützt das Ergebnis von Seli (Seli et al., 1998), dass FGF nicht mit der Oozytenqualität, dem Reifegrad der Oozyten, der Fertilisationsrate und der Schwangerschaftsrate korreliert (Hamaddeh, C. Fischer-Hammadhe et al., 2003a).

Tabelle 29: Beziehung zwischen der Ätiologie der Sterilität und FGF-Konzentration im Serum und Follikelflüssigkeit

Parameter	PCO	Endometriose	Tubar bedingte Sterilität	Männlich bedingte Sterilität
Anzahl	20	17	19	19
FGF Serum pg/ml	$4,8 \pm 2,3$	$5,9 \pm 3,0$	$10,2 \pm 11,3$	$7,4 \pm 4,5$
FGF FF pg/ml	$104 \pm 39,0$	$125 \pm 74,9$	$128,7 \pm 75,9$	$102,35 \pm 47,0$

Das gemeinsame Merkmal der Frauen mit PCO und PCOS ist der im Ultraschall sichtbar vermehrte Stromaanteil und die vermehrten Follikelzysten im Ovar. Es ist bekannt, dass bFGF in dem komplexen Prozess der Angiogenese mit eingebunden ist. bFGF ist in der Lage, die Migration und die Proliferation von Endothelzellen *in vitro* zu stimulieren. Man nimmt an, dass bFGF auch auf die Angiogenese in reproduktivem Gewebe, wie Corpus luteum, Uterus oder Plazenta, Einfluss nimmt (Folkman, Klagsbrun et al., 1988), (Gospodarowicz, 1989). Möglicherweise ist bFGF für die vaskulären Veränderungen am Follikel zum Zeitpunkt der Ovulation mitverantwortlich. Auch eine Mitwirkung des FGF bei der tumorvermittelten Angiogenese wird diskutiert.

In unserer Arbeit waren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Serumkonzentration an bFGF nachweisbar.

Dirix untersuchte mittels ELISA die Konzentration von bFGF und VEGF im Serum bei Tumorpatientinnen mit Brustkrebs, Ovarialtumor, Nierentumor und Colonkarzinom. Dabei waren die Konzentrationen von bFGF bei den Patienten erhöht. Der Autor macht die Progression der Metastasen und die damit verbundene Angiogenese verantwortlich (Dirix & Vermeulen, 1997).

Unterstützung findet diese These durch Fujimoto, der bei Ovarialtumoren erhöhte Level an bFGF und mRNA feststellte (Fujimoto & Ichigo, 1997).

Di Blasio sieht bFGF mit seinen mitogenen und angiogenetischen Eigenschaften als möglichen Regulator der Ovarialtumorzellproliferation mittels autokriner Mechanismen an (Di Blasio, Carniti et al., 1995). Wenn man davon ausgeht, dass

das veränderte Ovar durch die vielen Follikelzysten ein dichteres Netz an Kapillaren besitzt, könnte man eine erhöhte Konzentration an bFGF in Bezug auf seine angiogenetische Potenz vermuten (Di Blasio, Carniti et al., 1995).

Ein direkter Zusammenhang von bFGF von DHEAS stellte sich in dieser Studie nicht dar.

Die Erhöhung des DHEAS liegt womöglich an einer veränderten Aktivität der 17-alpha-Hydroxylase, die eventuell durch eine gestörte LH-Sekretion hervorgerufen wird (Tamura, Asakai et al., 1991).

Andere vermuten eine Dysfunktion der 11-beta-Hydroxysteroiddehydrogenase bei hyperandrogenen Frauen (Tamura, Asakai et al., 1991). Ausgehend von den Arbeiten von Hurwitz (Hurwitz, Hernandez et al., 1990) und McAllister (McAllister, Byrd, et al. 1994), die eine Beeinflussung der Steroidgenese durch die Modulation von Enzymen der Steroidsynthese des bFGF sehen, ist eine Rolle des bFGF bei der Pathogenese des PCOS möglich.

6.9 Nachweis von PDGF in der Follikelflüssigkeit

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten einen Nachweis von PDGF-AB im Serum von 100 %. Die Follikelflüssigkeit war nur in 8 von 134 (6%) der Proben für PDGF-AB positiv. Der Minimalwert betrug 8,8 pg/ml, der Maximalwert 58,9 pg/ml. Die für PDGF-AB positiven Proben befanden sich ausschließlich unter den Frauen mit PCO und PCOS.

Die in einer anderen Arbeit untersuchten, während der Oozytenaspiration gewonnenen Follikelflüssigkeiten von IVF-Patientinnen mit tubarer Infertilität mittels Radioimmunassay enthielten ebenfalls kein PDGF. Die zugehörigen Seren waren ausnahmslos für PDGF positiv (Svalander, Holmes et al., 1991).

McWilliam und Leake wiesen in ihrer Studie PDGF-AB mittels ELISA in 70 % der Fälle in der Follikelflüssigkeit präovulatorischer Follikel von *in vitro* fertilisierten Frauen nach. Die Sensitivität des Tests wurde mit 31,25 pg/ml angegeben. Die Konzentrationen reichten von < 31,25 pg/ml bis 1500 pg/ml. Der Nachweis von PDGFR in den Granulosazellen gelang mittels Immunfluoreszenzfärbung nicht. In

den Immunoblotanalysen konnten hingegen PDGF in einer löslichen Fraktion nachgewiesen werden (McWilliam, Leake et al., 1995).

Hammadeh bestimmte neben EGF auch PDGF mittels ELISA (Assay- Sensitivität 8,4 pg/ml) in der Follikelflüssigkeit präovulatorischer Follikel von Patientinnen im Rahmen einer ICSI-Behandlung, um die Ergebnisse mit den unterschiedlichen Stimulationsprotokollen (hMG, FSH, FSH/hMG) in Beziehung zu setzen. Dabei konnte PDGF in allen Follikelflüssigkeiten nachgewiesen werden. (Hammadeh, Fischer-Hammadeh et al., 2000). Die Ergebnisse sind in Tabelle 30 aufgeführt.

Tabelle 30: Konzentrationen von PDGF in der Follikelflüssigkeit

	HMG (n = 38)	FSH (n = 18)	FSH/hMG (n = 29)
PDGF pg/ml	358 ± 372,2	266,1 ± 138	268 ± 166

In einer anderen Arbeit wurde ebenfalls PDGF in Follikelflüssigkeiten von high- und low-Respondern im Rahmen der ICSI-Behandlung untersucht. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ergab sich nicht. Die gemessenen Konzentrationen sind in Tabelle 31 aufgeführt (Hammadeh, Fischer-Hammadeh et al., 2003b).

Tabelle 31: Konzentrationen von PDGF in der Follikelflüssigkeit

	low-responder (n = 49)	high-responder (n = 34)
PDGF pg/ml	249,8 ± 150,1	387 ± 357,0

Weitere Untersuchungen zum Nachweis von PDGF-AB in der Follikelflüssigkeit liegen nicht vor, um unsere Ergebnisse zu vergleichen.

6.10 Die Wirkungsweise von PDGF am Ovar

PDGF ist in die Verhinderung des biologischen Zelltods involviert, indem er als Survivalfaktor bei verschiedenen Zelltypen, so auch beim präovulatorischen Follikel agiert (Kiess & Gallaher, 1998).

Anderson und Lee (Anderson & Lee, 1993) untersuchten Granulosazellen antraler Follikel der Ratte *in vitro* auf deren Antwort auf PDGF. Dabei konnten PDGF alleine mit oder ohne FSH keine biosynthetischen Aktivitäten nachgewiesen werden. Nur

in Verbindung mit anderen Wachstumsfaktoren war es möglich, eine Differenzierung des Follikels herbeizuführen.

Duleba zeigte eine Steigerung der Theka interna-DNS der Ratte bei der Behandlung mit PDGF bzw. PDGF und IGF-1. Es stellte sich weiter heraus, dass nur Thekazellen, die hinsichtlich ihrer Steroidgenese inaktiv waren, durch PDGF vermehrt wurden. IGF-1 vermehrte hinsichtlich ihrer Steroidgenese aktive Thekazellen. Es ist anzunehmen, dass diese unterschiedliche Beeinflussung der Thekazelle durch Wachstumsfaktoren für die selektive Entwicklung der Stromazelle und der Theka interna und Theka externa verantwortlich ist. PDGF scheint dabei das Wachstum des Stroma und der Theka externa zu stimulieren und unabhängig von IGF-1 zu agieren. Dabei scheint die Wirkung zellspezifisch zu sein (Duleba, Spaczynski et al., 1999).

Schomberg und Mondschein (Mondschein & Schomberg, 1981b) beschrieben eine verstärkende Wirkung des PDGF auf die FSH-stimulierte LH-Rezeptor Expression der Granulosazelle.

Knecht und Catt (Knecht & Catt, 1983) konnten ebenfalls an Granulosazellen der Ratte eine Erhöhung der FSH-induzierten cAMP und Progestin- Akkumulation und der LH-Rezeptor-Formation feststellen. Der Nachweis eines signifikant mitogenen Effekts des PDGF auf die Granulosazelle gelang nicht. Somit ist eine Beeinflussung der Follikelreifung im letzten Stadium der humanen Follikulogenese durch die Unterstützung der Luteinisierung durch PDGF möglich. Entweder spiegeln sich diese Prozesse nicht in der Konzentration in der Follikelflüssigkeit wider, oder die Luteinisierung der Follikel ist zum Untersuchungszeitpunkt zu weit fortgeschritten. Die alleinige Untersuchung der Follikelflüssigkeit ist für die Klärung dieser Frage nicht ausreichend.

In einer anderen Studie konnte PDGF, zusammen mit EGF, eine Steigerung der Proliferationsrate hervorrufen (May, Frost et al., 1990). PDGF plus IGF-1 führte hier zu einer Erhöhung der mitotischen Aktivität der Granulosazelle. Wie diese synergistischen Funktionen zustande kommen, ist nicht geklärt.

Lafrance (Lafrance, Croze et al., 1993) beobachtete eine Steigerung der Plasminaktivatoraktivität nach der Behandlung präovulatorischer Follikel mit PDGF.

Tilly und Johnson (Tilly & Johnson, 1990) konnten im präovulatorischen Follikel des Huhns keinen signifikanten Effekt des PDGF auf die Plasminaktivatoraktivität nachweisen.

6.11 PDGF und seine Rolle beim PCO und PCOS

Die mitogene Wirkung des PDGF auf verschiedene Zellen ist bekannt. PDGF ist im Rahmen seiner Funktion bei der Wundheilung, aber auch bei der Reparatur der Follikelrupturstelle am Ovar beteiligt. Dabrow wies einen verstärkenden Effekt des PDGF auf die Proliferation der humanen ovariellen Epithelzelle nach und vermutet eine Beteiligung bei der Entstehung von Ovarialtumoren. In früheren Studien wurde PDGF mittels immunhistochemischer Analysen in malignen Tumorzellen aufgefunden. Gutartige Tumoren waren im Vergleich negativ bzw. hatten signifikant geringere Konzentrationen an PDGF (Dabrow, Francesco et al., 1998).

Die physiologische Rolle des PDGF wurde durch das Auffinden in den Stromazellen untermauert und ist mit den mitogenen Eigenschaften des PDGF vereinbar. Der von Dabrow vermutete spezifische Einfluss des PDGF auf die Theka externa und die am humanen Ovar gemachten Beobachtungen könnten eine Rolle bei der Pathogenese des PCO/PCOS spielen, so dass die in der vorliegenden Studie erhöhte Konzentration von PDGF bei Frauen mit PCO oder PCOS in der Follikelflüssigkeit mit dem erhöhten Stromaanteil des polyzystisch veränderten Ovar erklärt werden könnte.

PDGF ist strukturell und biologisch mit dem VEGF und dem Plazenta growth factor verwandt (Khachigian & Chesterman, 1992). *In vitro* wurden in Endothelzellen mRNA für PDGF-AB und B nachgewiesen. Bei fehlendem Nachweis des PDGF-Rezeptors ging man von einer parakrinen Vermittlung des PDGF-Effektes aus. *In vitro* und *in situ* wurden in Endothelzellen von Kapillaren PDGF-Rezeptoren nachgewiesen. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass PDGF als angiogenetischer Faktor wirkt (Dirks & Bloemers, 1995). Ein Effekt des PDGF auf die verstärkte Vaskularisierung des polyzystisch veränderten Ovars ist zu diskutieren.

7 Zusammenfassung und Ausblick

Mit der Entdeckung und Untersuchung von Wachstumsfaktoren wurde deutlich, dass der ovarielle Zyklus der Frau nicht allein durch Hormone moduliert wird. Verschiedene Studien lassen vermuten, dass Wachstumsfaktoren auf vielfältige Art und Weise den ovariellen Regelkreis ergänzen, dabei wird ebenfalls eine Beteiligung an der Entstehung von Störungen der ovariellen Regulation diskutiert.

Die Analyse der Wachstumsfaktoren EGF, bFGF und PDGF-AB sollten Erkenntnisse über ihre Rolle in der ovariellen Regulation liefern und zur Aufklärung ihres Mitwirkens bei der Entstehung der Ovarialinsuffizienz beitragen.

In die Studie wurden 27 Patientinnen aufgenommen und je nach Krankheitsbild drei Gruppen zugeordnet. Die erste Gruppe wurde von sterilen Frauen mit unauffälliger Anamnese gestellt. Der zweiten und dritten Gruppe wurden Frauen mit polyzystisch verändertem Ovar mit normaler Endokrinologie und Frauen mit polyzystisch verändertem Ovar und abweichender Endokrinologie zugeordnet. Mittels ELISA wurden die Konzentrationen von EGF, bFGF und PDGF-AB im Serum und in der Follikelflüssigkeit bestimmt.

EGF und PDGF-AB waren im Serum in 100 % der Proben enthalten. In der Follikelflüssigkeit waren nur 29 % der Proben für EGF positiv, 6% der Proben enthielten PDGF-AB. EGF und PDGF-AB waren im Serum deutlich höher als in der Follikelflüssigkeit konzentriert.

bFGF war im Serum in 59,5 % und in der Follikelflüssigkeit in 93,3 % der Fälle enthalten. Es ergab sich eine höhere Konzentration in der Follikelflüssigkeit als im Serum. Der Vergleich der Konzentrationen im Serum zwischen den drei Gruppen erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Krankheitsbildern.

Der Vergleich der Follikelflüssigkeiten bezogen auf die Patientengruppen erbrachte folgende Ergebnisse. Die Konzentration an EGF und bFGF der Frauen mit PCO und PCOS war signifikant höher als bei den sterilen Frauen mit unauffälliger Anamnese. Die Frauen mit PCO und PCOS unterschieden sich nicht.

Die Gruppe n war für PDGF-AB negativ. Insgesamt 8 Proben waren in den Gruppen PCO und PCOS für PDGF-AB positiv. Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen den Wachstumsfaktoren und den Hormonen im Serum bzw. in der Follikelflüssigkeit ergaben sich nicht. Eine Korrelation zwischen den Faktoren und dem BMI sowie dem Follikelvolumen konnte nicht ermittelt werden.

Dass der EGF in der Follikelflüssigkeit enthalten ist, wird durch Ergebnisse früherer Studien unterstützt. Jedoch weisen die bisher mittels ELISA oder Radioimmunassay analysierten Follikelflüssigkeiten auf präovulatorische Follikel unterschiedliche Ergebnisse auf. In Studien gelang der immunhistochemische Nachweis von EGF in den Theka- und Granulosazellen in humanen präovulatorischen Follikeln und der Rezeptor für EGF wurde in den Granulosazellen identifiziert. EGF wurde dabei in verschiedenen Entwicklungsphasen des Follikels aufgefunden, so dass dem EGF eine Bedeutung in den unterschiedlichen Stadien der Follikelreifung zukommt. Dies geschieht möglicherweise über eine auto- oder parakrine Wirkung des EGF. Über die Wirkung des EGF auf das FSH und die Steroidsynthese liegen unterschiedliche Meinungen vor. Eine hemmende sowie fördernde Wirkung des EGF auf das FSH wird diskutiert.

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen erhöhten Konzentrationen an EGF bei den Frauen mit PCO und PCOS, könnten über die Hemmung des FSH zu einer Erhöhung des Schwellenwerts führen und somit der Rekrutierung des dominanten Follikels entgegenwirken.

Der in dieser Arbeit geführte Nachweis von bFGF in der Follikelflüssigkeit ist in der Vergangenheit auch immunhistochemisch in humanen Granulosazellen und Thekazellen in Follikeln im Primordialstadium bis zum Lutealstadium gelungen. Dem bFGF wird eine mitogene und proliferative Rolle während der Follikulogenese zugeschrieben. Studien zeigen sowohl einen hemmenden als auch fördernden Effekt des bFGF auf die FSH-vermittelte LH-Rezeptor-Expression. Sogar eine bimodale Funktion wird diskutiert. Vergleichbare Studien zu den in dieser Untersuchung gemessenen erhöhten Konzentrationen an bFGF bei Frauen mit PCO und PCOS liegen nicht vor. bFGF ist im Tierversuch in der Lage, die 17-alpha-Hydroxylase-Expression zu hemmen und die Menge an produzierten Östrogenen herabzusetzen und könnte somit durch die Modulation von Enzymen der Steroidsynthese an der Entstehung des polyzystischen Ovars mitwirken. Die Beteiligung des bFGF bei der Angiogenese in reproduktivem Gewebe, wie Corpus luteum oder Ovarialtumoren, wird angenommen. Die hier in der Follikelflüssigkeit nachgewiesenen erhöhten bFGF-Konzentrationen bei Patientinnen mit PCOS oder PCO könnten mit der vermehrten Vaskularisierung des zystisch veränderten Ovars in Zusammenhang stehen, wobei eine Erhöhung der Konzentration im Serum nicht beobachtet wurde.

Der Nachweis von PDGF-AB in der Follikelflüssigkeit ist in dieser Arbeit nur in 6 % der Fälle gelungen. In vergleichbaren Studien war der Nachweis für PDGF-AB in der Follikelflüssigkeit positiv und negativ. Immunhistochemisch war die Granulosazelle für PDGF-AB-negativ. Der Einfluss von PDGF auf den Follikel wird durch frühere Studien belegt. Eine Funktion als Survivalfaktor im präovulatorischen Follikel wird vermutet. Die von einigen Arbeiten im Tierversuch beschriebene verstärkende Wirkung des PDGF auf die FSH- vermittelte LH-Rezeptor-Expression könnte eine Mitbeteiligung des PDGF bei dem Prozess der Luteinisierung vermuten lassen, der in den in dieser Arbeit untersuchten Follikeln möglicherweise schon weitgehend abgeschlossen war. Die angiogenetische Potenz des PDGF-AB sollte in Verbindung mit dem bisher unsicheren Nachweis bei Frauen mit PCO und PCOS weiter untersucht werden. PDGF scheint im Tierversuch für die selektive Entwicklung der Stromazelle und der Theka interna und Theka externa verantwortlich zu sein und wirkt mitogen auf die ovarielle Epithelzelle des Ovars und könnte somit bei der Entstehung des polyzystisch veränderten Ovars mitwirken.

Die Bestimmung der Konzentrationen der Wachstumsfaktoren in der Follikelflüssigkeit bietet eine Möglichkeit der quantitativen Erfassung. Es ist aber anzunehmen, dass die Konzentrationen in der Follikelflüssigkeit, die im Follikel stattfindenden Prozesse nicht vollständig widerspiegeln. Daher ist die Bewertung der erhaltenen Ergebnisse nur im Zusammenhang mit den Erkenntnissen anderer Untersuchungen sinnvoll. Die Einordnung unserer Ergebnisse gestaltete sich durch die Vielfalt der bisher auf diesem Gebiet erhaltenen Untersuchungsergebnisse schwierig. Weitere Untersuchungen der Follikelflüssigkeit mittels ELISA unter standardisierten Bedingungen sollten folgen, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen. Bei der Auseinandersetzung mit der hier behandelten Thematik wird deutlich, dass die Untersuchung verschiedener Spezies unterschiedliche Ergebnisse hervorbringt und die Übertragung gewonnener Erkenntnisse nur mit Einschränkungen auf das menschliche Ovar bzw. Follikel möglich ist. In der Literatur werden unterschiedliche Theorien über die Wirkung der Wachstumsfaktoren auf das Ovar aufgeführt. Im Mittelpunkt der Bemühungen müssen dabei Untersuchungen am humanen Ovar stehen.

8 Literaturverzeichnis

- Abe Y, Sagawa T, Sakai K, Kimura S: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for human epidermal growth factor (hEGF). *Clin Chim Acta* 1987; 168: 87-95.
- Adams J, Franks S, Polson DW, et al: Multifollicular ovaries: clinical and endocrine features and response to pulsatile gonadotropin releasing hormone. *Lancet* 1985; 2: 1375-1379.
- Adashi EY, Resnick CE, Croft CS, May JV, Gospodarowicz D: Basic fibroblast growth factor as a regulator of ovarian granulosa cell differentiation: a novel non-mitogenic role. *Mol.Cell Endocrinol.* 1988; 55: 7-14.
- Anderson E, Lee GY: The participation of growth factors in simulating the quiescent, proliferative, and differentiative stages of rat granulosa cells grown in a serum-free medium. *Tissue Cell* 1993; 25: 49-72.
- Angervo M, Koistinen R, Seppala M: Epidermal growth factor stimulates production of insulin-like growth factor-binding protein-1 in human granulosa-luteal cells. *J Endocrinol* 1992; 134: 127-131.
- Antoniades HN, Scher CD, Stiles CD: Purification of human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 1809-1813.
- Artini PG, Battaglia C, D'Ambrogio G, et al: Relationship between human oocyte maturity, fertilization and follicular fluid growth factors. *Hum Reprod* 1994; 9: 902-906.
- Baird A, Hsueh AJ: Fibroblast growth factor as an intraovarian hormone: differential regulation of steroidogenesis by an angiogenic factor. *Regul Pept* 1986; 16: 243-250.
- Barres BA, Hart IK, Coles HS, et al: Cell death and control of cell survival in the oligodendrocyte lineage. *Cell* 1992; 70: 31-46.
- Bendell JJ, Dorrington JH: Epidermal growth factor influences growth and differentiation of rat granulosa cells. *Endocrinology* 1990; 127: 533-540.

- Blair EI, Kim IC, Estes JE, Keski-Oja J, Schomberg DW: Human platelet-derived growth factor preparations contain a separate activity which potentiates follicle-stimulating hormone-mediated induction of luteinizing hormone receptor in cultured rat granulosa cells: evidence for transforming growth factor-beta. *Endocrinology* 1988; 123: 2003-2008.
- Buck PA, Schomberg DA: (125I)iodo-epidermal growth factor and mitotic responsiveness of porcine granulosa cells are modulated by differentiation and follicle-stimulating hormone.
- Budnik LT, Mukhopadhyay AK: Modulatory action of epidermal growth factor on differentiated human granulosa lutein cells: cross-talk between ligand activated receptors for EGF and gonadotropin. *Mol.Cell Endocrinol.* 1996; 124: 141-150.
- Burghen C.A. GJRuKAE: Correlation of hyperandrogenism with hyperinsulinism in polycystic ovarian disease. *J.Clin.Endocrinol.Metab.* 1980; 50: 113-116.
- Canalis E: Effect of platelet-derived growth factor on DNA and protein synthesis in cultured rat calvaria. *Metabolism* 1981; 30: 970-975.
- Cassel D, Rothenberg P, Zhuang YX, Deuel TF, Glaser L: Platelet-derived growth factor stimulates Na⁺/H⁺ exchange and induces cytoplasmic alkalization in NR6 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983; 80: 6224-6228.
- Chikazawa K, Araki S, Tamada T: Morphological and endocrinological studies on follicular development during the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1986; 62: 305-313.
- Claesson-Welsh L: Signal transduction by the PDGF receptors. *Prog Growth Factor Res* 1994; 5: 37-54.
- Cochran BH, Reffel AC, Stiles CD: Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell* 1983; 33: 939-947.
- Conway GS, Honour JW, Jacobs HS: Heterogeneity of the polycystic ovary syndrome: clinical, endocrine and ultrasound features in 556 patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1989; 30: 459-470.

- Cooke RM, Wilkinson AJ, Baron M, et al: The solution structure of human epidermal growth factor. *Nature* 1987; 327: 339-341.
- Dabrow MB, Francesco MR, McBrearty FX, Caradonna S: The effects of platelet-derived growth factor and receptor on normal and neoplastic human ovarian surface epithelium. *Gynecol Oncol* 1998; 71: 29-37.
- Daopin S, Piez KA, Ogawa Y, Davies DR: Crystal structure of transforming growth factor-beta 2: an unusual fold for the superfamily [see comments]. *Science* 1992; 257: 369-373.
- Di Blasio AM, Carniti C, Vigano P, Vignali M: Basic fibroblast growth factor and ovarian cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 53: 375-379.
- Dirix I, Vermeulen P: Elevated levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera cancer patients. *Br J Cancer* 1997; 76(2): 238-243.
- Dirks RP, Bloemers HP: Signals controlling the expression of PDGF. *Mol.Biol.Rep.* 1995; 22: 1-24.
- Doraiswamy V: Expression of fibroblast growth factor receptors in ovine corpora lutea. *Proc.35th Annu.Mtg.Am.Soc.Cell Biol.*, Washington, DC 1995.
- Driancourt MA, Thuel B: Control of oocyte growth and maturation by follicular cells and molecules present in follicular fluid. A review. *Reprod Nutr Dev* 1998; 38: 345-362.
- Duleba AJ, Spaczynski RZ, Arici A, Carbone R, Behrman HR: Proliferation and differentiation of rat theca-interstitial cells: comparison of effects induced by platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-I. *Biol Reprod* 1999; 60: 546-550.
- Eden JA, Jones J, Carter GD, Alagband-Zadeh J: Follicular fluid concentrations of insulin-like growth factor 1, epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and sex-steroids in volume matched normal and polycystic human follicles. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1990; 32: 395-405.

- Eden JA, Place J, Carter GD, Alaghband-Zadeh J, Pawson M: Is the polycystic ovary a cause of infertility in the ovulatory woman? *Clin Endocrinol (Oxf)* 1989; 30: 77-82.
- Eppig JJ, O'Brien MJ: Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 1996; 54: 197-207.
- Erickson GF: Physiologic basis of ovulation induction. *Semin.Reprod.Endocrinol.* 1996; 14: 287-297.
- Erickson GF, Magoffin DA, Garzo VG, Cheung AP, Chang RJ: Granulosa cells of polycystic ovaries: are they normal or abnormal? *Hum.Reprod.* 1992; 7: 293-299.
- Esch F, Baird A, Ling N, et al: Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 6507-6511.
- Felberbaum R, Ortmann O: Endokrine Kontrolle der Ovarialfunktion und Pathophysiologie endokriner Ovarialfunktionsstörungen. In: *Weibliche Sterilität: Ursachen, Diagnostik und Therapie*. Diedrich K, ed. Berlin: Springer, 1998; 1-22.
- Folkman J, Klagsbrun M, Sasse J, Wadzinski M, Ingber D, Vlodavsky I: A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor-- is stored within basement membrane. *Am J Pathol* 1988; 130: 393-400.
- Fox GM, Schiffer SG, Rohde MF, Tsai LB, Banks AR, Arakawa T: Production, biological activity, and structure of recombinant basic fibroblast growth factor and an analog with cysteine replaced by serine. *J Biol Chem* 1988; 263: 18452-18458.
- Franks S: Polycystic ovary syndrome: a changing perspective. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1989; 31: 87-120.
- Franks S, Mason HD, Polson DW, Winston RM, Margara R, Reed MJ: Mechanism and management of ovulatory failure in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 1988; 3: 531-534.

- Fredj-Reygrobelle D, Plouet J, Delayre T, Baudouin C, Bourret F, Lapalus P: Effects of aFGF and bFGF on wound healing in rabbit corneas. *Curr Eye Res* 1987; 6: 1205-1209.
- Fujimoto J, Ichigo S: Expression of basic fibroblast growth factor and its mRNA in advanced ovarian cancer. *Eur* 1997; 18(5): 349-352.
- Gaetje R: IGF-I and EGF influence on steroid secretion and morphology of human granulosa cells of IVF-cycles and natural cycles in vitro. *Clin.Exp.Obstet.Gynecol.* 1994; 21: 14-23.
- Geisthövel F: Geschlechtsreife. In: *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Käser O, Friedberg V, Ober KG, Thomsen K, Zander J, eds. Stuttgart: Thieme, 1992.
- Geyter C: Ovarielle Funktionsstörungen bei weiblicher Sterilität. In: *Endokrinologie und Reproduktionsmedizin*. Krebs D, ed. München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1994; 174-190.
- Giordano G, Barreca A, Minuto F: Growth factors in the ovary. *J.Endocrinol.Invest.* 1992; 15: 689-707.
- Gore- Langton R, Armstrong D: Follikular steroidogenesis and its control. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill J, eds. New york: Raven Press, 1988; 331-385.
- Gospodarowicz D: Fibroblast growth factor. *Crit Rev Oncog* 1989; 1: 1-26.
- Gospodarowicz D, Bialecki H: Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine, and human origin. *Endocrinology* 1979; 104: 757-764.
- Gospodarowicz D, Ill CR, Birdwell CR: Effects of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation in vitro. II. Proliferative response of luteal cells to FGF but not EGF. *Endocrinology* 1977; 100: 1121-1128.
- Gospodarowicz D: Lokalisation of fibroblast growth factor and its effect alone and with hydrocortisone an T3T cell growth. *Nature* 1974; 249: 123-129.
- Gougeon A: Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1986; 1: 81-87.

- Gougeon A, Lefevre B: Evolution of the diameters of the largest healthy and atretic follicles during the human menstrual cycle. *J Reprod Fertil* 1983; 69: 497-502.
- Gregory H, Thomas CE, Young JA, Willshire IR, Garner A: The contribution of the C-terminal undecapeptide sequence of urogastrone-epidermal growth factor to its biological action. *Regul.Pept.* 1988; 22: 217-226.
- Grotendorst GR, Chang T, Seppa HE, Kleinman HK, Martin GR: Platelet-derived growth factor is a chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 1982; 113: 261-266.
- Guthridge M, Bertolini J, Cowling J, Hearn MT: Localization of bFGF mRNA in cyclic rat ovary, diethylstilbesterol primed rat ovary, and cultured rat granulosa cells. *Growth Factors* 1992; 7: 15-25.
- Hammadeh, C. Fischer-Hammadeh, et al: Fibroblast growth Factor, Intracellular Adhaesion Molecule Level in Serum and Follicular Fluid of Infertile Woman with Polycystic Ovarian Syndrom, Endometriosis und Tubal damage,an theior Effect on ICSI Outcome. *AJRI* 2003a; 50:124-130.
- Hammadeh, C. Fischer-Hammadeh, et al: Comparison between Cytokine Conzentration in Follikular Fluid of Poor and High Responder Patients and theirt Influence opf ICSI-outcome.*AJRI* 2003b; 50: 131-136.
- Hammadeh, B. Braemert, et al: Relationship Between Ovarian Stimulation Regimen and Cytokine Concentration in Follikular Fluid and their Effect on Fertilisation and Pragnancy Outcome of Patients Undergoing ICSI Programm. *AJRI* 2000; 43: 12-20.
- Haning RFC: Metabolic clearance rate of dehydroepiandrosterone sulfat, its metabolism to testosterone, and its intrafollicular metabolism to dehydroepiandrosterone, androstenione, testosterone and dehydrotestosterone in vivo. *Endocrinol Meatb* 1991; 72: 1088-1095.
- Hart CE, Bailey M, Curtis DA, et al: Purification of PDGF-AB and PDGF-BB from human platelet extracts and identification of all three PDGF dimers in human platelets. *Biochemistry* 1990; 29: 166-172.

- Heldin CH: Structure of platelet-derived growth factor: Implications for functional properties. *Growth Factors* 1993; 8: 245-252.
- Heldin CH, Backstrom G, Ostman A, et al: Binding of different dimeric forms of PDGF to human fibroblasts: evidence for two separate receptor types. *EMBO J* 1988; 7: 1387-1393.
- Heldin CH, Westermark B, Wasteson A: Platelet-derived growth factor. Isolation by a large-scale procedure and analysis of subunit composition. *Biochem J* 1981; 193: 907-913.
- Heldin CH, Westermark B, Wasteson A: Platelet-derived growth factor: purification and partial characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 3722-3726.
- Hollenberg MD, Gregory H: Epidermal growth factor-urogastrone: biological activity and receptor binding of derivatives. *Mol. Pharmacol.* 1980; 17: 314-320.
- Homburg R, Amsterdam A: Polycystic ovary syndrome--loss of the apoptotic mechanism in the ovarian follicles? *J Endocrinol Invest* 1998; 21: 552-557.
- Homburg R: Polycystic ovary syndrome - from gynaecological curiosity to multisystem endocrinopathy. *Hum Reprod* 1996; 11: 29-39.
- Hoppe I, Starker W, Klinger G: Basisdiagnostik und Behandlung der weiblichen Sterilität. *Ärzteblatt Thüringen* 1996; 7: 47-49.
- Hoppe J, Weich HA, Eichner W: Preparation of biologically active platelet-derived growth factor type BB from a fusion protein expressed in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 1989; 28: 2956-2960.
- Hoppe J, Weich HA, Eichner W, Tatje D: Preparation of biologically active platelet-derived growth factor isoforms AA and AB. Preferential formation of AB heterodimers. *Eur J Biochem* 1990; 187: 207-214.
- Hosang M, Rouge M, Wipf B, Eggimann B, Kaufmann F, Hunziker W: Both homodimeric isoforms of PDGF (AA and BB) have mitogenic and chemotactic activity and stimulate phosphoinositol turnover. *J Cell Physiol* 1989; 140: 558-564.

- Hsueh AJ, Jones PB: Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. *Endocr.Rev.* 1981; 2: 437-461.
- Hurst BS, Zacur HA, Schlaff WD, Damewood MD, Berkovitz GD: The effect of epidermal growth factor in human granulosa cells varies with follicle size. *J Endocrinol Invest* 1993; 16: 143-145.
- Hurwitz A, Hernandez ER, Resnick CE, Packman JN, Payne DW, Adashi EY: Basic fibroblast growth factor inhibits gonadotropin-supported ovarian androgen biosynthesis: mechanism(s) and site(s) of action. *Endocrinology* 1990; 126: 3089-3095.
- Kanzaki M, Hattori M, Horiuchi R, Kojima I: Basic fibroblast growth factor induces luteinizing hormone receptor expression in the presence of insulin-like growth factor-I in ovarian granulosa cells. *Mol.Cell Endocrinol.* 1994; 101: 95-99.
- Keck C., Meinert Breckwoldt, Neulen J., Behre H.M. *Endokrinologie, Reproduktionsmedizin, Andrologie, Praxis der Frauenheilkunde*, Thieme Verlag 2002.
- Kelly JL, Sanchez A, Brown GS, Chesterman CN, Sleigh MJ: Accumulation of PDGF B and cell-binding forms of PDGF A in the extracellular matrix. *J Cell Biol* 1993; 121: 1153-1163.
- Khachigian LM, Chesterman CN: Platelet-derived growth factor and alternative splicing: a review. *Pathology.* 1992; 24: 280-290.
- Khan CRFJSBRS: The syndromes of insulin resistance and acanthosis nigricans: Insulin receptor disorder in man. *New Engl.J.Med.* 1976; 294: 739-745.
- Kiess W, Gallaher B: Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol* 1998; 138: 482-491.
- Klagsbrun M: The fibroblast growth factor family: structural and biological properties. *Prog Growth Factor Res* 1989; 1: 207-235.
- Knecht M, Catt KJ: Modulation of cAMP-mediated differentiation in ovarian granulosa cells by epidermal growth factor and platelet-derived growth factor. *J.Biol.Chem.* 1983; 258: 2789-2794.

- Knee R, Pitcher S: Basic fibroblast growth factor sense and antisense RNA transcripts are expressed in unfertilized human oocytes and differentiated adult tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 30;205(1): 577-583.
- Krebs D: Moderne Reproduktionstechniken. In: Endokrinologie und Reproduktionsmedizin. Krebs D, ed. München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1994; 250-277.
- Kundra V, Escobedo JA, Kazlauskas A, et al: Regulation of chemotaxis by the platelet-derived growth factor receptor- beta. *Nature* 1994; 367: 474-476.
- Lafrance M, Croze F, Tsang BK: Influence of growth factors on the plasminogen activator activity of avian granulosa cells from follicles at different maturational stages of preovulatory development. *J Mol Endocrinol* 1993; 11: 291-304.
- Landshman N, Belkin M, Ben-Hanan I, Ben-Chaim O, Assia E, Savion N: Regeneration of cat corneal endothelium induced in vivo by fibroblast growth factor. *Exp Eye Res* 1987; 45: 805-811.
- LaPolt PS, Yamoto M, Veljkovic M, et al: Basic fibroblast growth factor induction of granulosa cell tissue-type plasminogen activator expression and oocyte maturation: potential role as a paracrine ovarian hormone. *Endocrinology* 1990; 127: 2357-2363.
- LaRochelle WJ, May-Siroff M, Robbins KC, Aaronson SA: A novel mechanism regulating growth factor association with the cell surface: identification of a PDGF retention domain. *Genes Dev* 1991; 5: 1191-1199.
- LaRochelle WJ, Giese N, May-Siroff M, Robbins KC, Aaronson SA: Molecular localization of the transforming and secretory properties of PDGF A and PDGF B. *Science* 1990; 248: 1541-1544.
- Malamitsi-Puchner A., Sarandakou A., Baka S., Hasiakos D.: In vitro fertilisation: angiogenetic, proliferative and apoptotic factors in the follicular fluid. *Ann N Y Acad Sci* 2003 Nov; 997:124-128.
- Malamitsi-Puchner A., Sarandakou A., Stavroula G., Tzotis J.: Concentrations of angiogenic factors in follicular fluid and Oocyte-cumulus complex culture

medium from woman undergoing in vitro fertilization: association with oocyte maturity and fertilisation. *Fertil and Steril* 2001; Vol.76 (1):98-101.

Makino K, Morimoto M, Nishi M, et al: Proton nuclear magnetic resonance study on the solution conformation of human epidermal growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1987; 84: 7841-7845.

Maruo T, Ladines-Llave CA, Samoto T, et al: Expression of epidermal growth factor and its receptor in the human ovary during follicular growth and regression. *Endocrinology* 1993; 132: 924-931.

Mason HD, Margara R, Winston RM, Beard RW, Reed MJ, Franks S: Inhibition of oestradiol production by epidermal growth factor in human granulosa cells of normal and polycystic ovaries. *Clin.Endocrinol.(Oxf.)* 1990; 33: 511-517.

May JV, Frost JP, Bridge AJ: Regulation of granulosa cell proliferation: facilitative roles of platelet-derived growth factor and low density lipoprotein. *Endocrinology* 1990; 126: 2896-2905.

McAllister JM, Byrd W, Simpson ER: The effects of growth factors and phorbol esters on steroid biosynthesis in isolated human theca interna and granulosa-lutein cells in long term culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 106-112.

McDonald NQ, Lapatto R, Murray-Rust J, Gunning J, Wlodawer A, Blundell TL: New protein fold revealed by a 2.3-A resolution crystal structure of nerve growth factor. *Nature* 1991; 354: 411-414.

McDonald N, Murray-Rust J, Blundell T: Structure-function relationships of growth factors and their receptors. *Br.Med.Bull.* 1989; 45: 554-569.

McNatty KP: Hormonal correlates of follicular development in the human ovary. *Aust J Biol Sci* 1981; 34: 249-268.

McWilliam R, Leake RE, Coutts JR: Growth factors in human ovarian follicle fluid and growth factor receptors in granulosa-luteal cells. *Int.J.Biol.Markers* 1995; 10: 216-220.

Mondschein JS, Schomberg DW: Growth factors modulate gonadotropin receptor induction in granulosa cell cultures. *Science* 1981a; 211: 1179-1180.

- Mondschein JS, Schomberg DW: Platelet-derived growth factor enhances granulosa cell luteinizing hormone receptor induction by follicle-stimulating hormone and serum. *Endocrinology* 1981b; 109: 325-327.
- Montelione GT, Wuthrich K, Nice EC, Burgess AW, Scheraga HA: Solution structure of murine epidermal growth factor: determination of the polypeptide backbone chain-fold by nuclear magnetic resonance and distance geometry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1987; 84: 5226-5230.
- Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L: Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1986; 83: 7297-7301.
- Morris D: The etiology of hyperandrogenism in women. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1995; 7: 224-227.
- Neufeld G, Ferrara N, Schweigerer L, Mitchell R, Gospodarowicz D: Bovine granulosa cells produce basic fibroblast growth factor. *Endocrinology* 1987; 121: 597-603.
- Nexo E, Jorgensen E, Hansen MR: Human epidermal growth factor-on molecular forms present in urine and blood. *Regul Pept* 1992; 42: 75-84.
- Nister M, Hammacher A, Mellstrom K, et al: A glioma-derived PDGF A chain homodimer has different functional activities from a PDGF AB heterodimer purified from human platelets. *Cell* 1988; 52: 791-799.
- Noble M, Murray K, Stroobant P, Waterfield MD, Riddle P: Platelet-derived growth factor promotes division and motility and inhibits premature differentiation of the oligodendrocyte/type-2 astrocyte progenitor cell. *Nature* 1988; 333: 560-562.
- Normanno N, Ciardiello F, Brandt R, Salomon DS: Epidermal growth factor-related peptides in the pathogenesis of human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1994; 29: 11-27.
- Oefner C, D'Arcy A, Winkler FK, Eggimann B, Hosang M: Crystal structure of human platelet-derived growth factor BB. *EMBO J* 1992; 11: 3921-3926.

- Ortmann O: Diagnostik und Therapie des polycystischen Ovarsyndroms. In: Weibliche Sterilität: Ursache, Diagnostik und Therapie. Diedrich K, ed. Berlin: Springer, 1998; 60-72.
- Ostman A, Andersson M, Betsholtz C, Westermarck B, Heldin CH: Identification of a cell retention signal in the B-chain of platelet- derived growth factor and in the long splice version of the A-chain. *Cell Regul* 1991; 2: 503-512.
- Owen AJ, Pantazis P, Antoniades HN: Simian sarcoma virus--transformed cells secrete a mitogen identical to platelet-derived growth factor. *Science* 1984; 225: 54-56.
- Ozornek MH, Bielfeld P, Krussel JS, Hirchenhain J, Jeyendran RS, Koldovsky U: Epidermal growth factor and leukemia inhibitory factor levels in follicular fluid. Association with in vitro fertilization outcome. *J Reprod Med* 1999; 44: 367-369.
- Piquette GN, LaPolt PS, Oikawa M, Hsueh AJ: Regulation of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels by gonadotropins, growth factors, and gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1991; 128: 2449-2456.
- Polson DW, Adams J, Wadsworth J, Franks S: Polycystic ovaries--a common finding in normal women. *Lancet* 1988; 1: 870-872.
- Reeka N, Berg FD, Brucker C: Presence of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human ovarian tissue and follicular fluid. *Hum Reprod* 1998; 13: 2199-2205.
- Reilly CF, Broski JE: Differential effects of PDGF and PDGF-BB on vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 160: 1047-1054.
- Reynolds LP, Redmer DA: Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J Anim Sci* 1998; 76: 1671-1681.

- Richardson MC, Gadd SC, Masson GM: Augmentation by epidermal growth factor of basal and stimulated progesterone production by human luteinized granulosa cells. *J.Endocrinol.* 1989; 121: 397-402.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A: The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 1992; 70: 401-410.
- Robbins KC., Leal F., Pierce JH., and Aaronson SA. (1985). The v-sis/PDGF-2 transforming gene product localizes to cell membranes but is not a secretory proteine. *EMBO J.* 4:1783-1792.
- Rodriguez GC, Berchuck A, Whitaker RS, Schlossman D, Clarke-Pearson DL, Bast RCJ: Epidermal growth factor receptor expression in normal ovarian epithelium and ovarian cancer. II. Relationship between receptor expression and response to epidermal growth factor. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164: 745-750.
- Roseff SJ, Bangah ML, Kettel LM, et al: Dynamic changes in circulating inhibin levels during the luteal- follicular transition of the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 69: 1033-1039.
- Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF: The biology of platelet-derived growth factor. *Cell* 1986; 46: 155-169.
- Runnebaum B: Sterilität. In: *Gynaekologische Endokrinologie und Fortpflanzungsmedizin.* Anonymous 1994; 117-183.
- Sagle M, Bishop K, Ridley N, et al: Recurrent early miscarriage and polycystic ovaries. *BMJ* 1988; 297: 1027-1028.
- Scaramuzzi RJ, Downing JA: The in vivo effects of fibroblast growth factor and epidermal growth factor on the secretion of oestradiol, androstenedione and progesterone by the autotransplanted ovary in the ewe. *J Endocrinol* 1995; 146: 301-311.
- Schreiber G: Ursachen der Infertilität des Mannes. *Ärzteblatt Thüringen* 1996; 7: 44-47.

- Seli E, Zeyneloglu HB, Senturk LM, Bahtiyar OM, Olive DL, Arici A: Basic fibroblast growth factor: peritoneal and follicular fluid levels and its effect on early embryonic development. *Fertil Steril* 1998; 69: 1145-1148.
- Seno M, Sasada R, Iwane M, et al: Stabilizing basic fibroblast growth factor using protein engineering. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 151: 701-708.
- Seppa H, Grotendorst G, Seppa S, Schiffmann E, Martin GR: Platelet-derived growth factor in chemotactic for fibroblasts. *J Cell Biol* 1982; 92: 584-588.
- Serta RT, Seibel MM, The influence of epidermal growth factor on progesterone production by human granulosa-luteal cells in culture. *Hum. Reprod.* 1993; 8:1005-10.
- Siegbahn A, Hammacher A, Westermarck B, Heldin CH: Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *J Clin Invest* 1990; 85: 916-920.
- Spicer LJ, Alpizar E, Vernon RK: Insulin-like growth factor-I receptors in ovarian granulosa cells: effect of follicle size and hormones. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 102: 69-76.
- Steenfos HH: Growth factors and wound healing. *Scand.J.Plast.Reconstr.Surg.Hand Surg.* 1994; 28: 95-105.
- Steinkampf MP, Mendelson CR, Simpson ER: Effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the levels of mRNA encoding aromatase cytochrome P-450 of human ovarian granulosa cells. *Mol.Cell Endocrinol.* 1988; 59: 93-99.
- Stewart CJ, Owens OJ, Richmond JA, McNicol AM: Expression of epidermal growth factor receptor in normal ovary and in ovarian tumors. *Int J Gynecol Pathol* 1992; 11: 266-272.
- Stirling D, Waterman MR, Simpson ER: Expression of mRNA encoding basic fibroblast growth factor (bFGF) in bovine corpora lutea and cultured luteal cells. *J Reprod Fertil* 1991; 91: 1-8.
- Stoker M, Gherardi E: Regulation of cell movement: the motogenic cytokines. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1072: 81-102.

- Svalander PC, Holmes PV, Olovsson M, Wikland M, Gemzell-Danielsson K, Bygdeman M: Platelet-derived growth factor is detected in human blastocyst culture medium but not in human follicular fluid--a preliminary report. *Fertil.Steril.* 1991; 56: 367-369.
- Tamura M, Sasano H, Suzuki T, et al: Expression of epidermal growth factors and epidermal growth factor receptor in normal cycling human ovaries. *Hum.Reprod.* 1995; 10: 1891-1896.
- Tamura K, Asakai R, Okamoto R: Basic fibroblast growth factor in rat corpus luteum stimulates prostaglandin F₂-alpha production. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178: 393-399.
- Thompson P, Desbordes JM, Giraud J, Pouliquen Y, Barritault D, Courtois Y: The effect of an eye derived growth factor (EDGF) on corneal epithelial regeneration. *Exp Eye Res* 1982; 34: 191-199.
- Tilly JL, Johnson AL: Effect of several growth factors on plasminogen activator activity in granulosa and theca cells of the domestic hen. *Poult Sci* 1990; 69: 292-299.
- Vlodavsky I, Brown KD, Gospodarowicz D: A comparison of the binding of epidermal growth factor to cultured granulosa and luteal cells. *J Biol Chem* 1978; 253: 3744-3750.
- Volpe A, Artini PG: Effects of growth hormone administration in addition to gonadotrophins in normally ovulating women and polycystic ovary syndrome (PCO) patients. *Hum Reprod* 1992; 7(10): 1347-1352.
- Volpe A, Coukos G, D'Ambrogio G, Artini PG, Genazzani AR: Follicular fluid steroid and epidermal growth factor content, and in vitro estrogen release by granulosa-luteal cells from patients with polycystic ovaries in an IVF/ET program. *Eur.J.Obstet.Gynecol.Reprod.Biol.* 1991; 42: 195-199.
- Wandji SA, Srsen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE: Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biol Reprod* 1996; 55: 942-948.
- Watson R, Anthony F, Pickett M, Lambden P, Masson GM, Thomas EJ: Reverse transcription with nested polymerase chain reaction shows expression of

- basic fibroblast growth factor transcripts in human granulosa and cumulus cells from in vitro fertilisation patients. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 187: 1227-1231.
- Wei Z, Zhang L, Li M: [Regulation of ovarian follicular development by epidermal growth factor in IVF superovulation cycles]. *Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih* 1997; 32: 87-89.
- Westergaard LG, Yding AC, Byskov AG: Epidermal growth factor in small antral ovarian follicles of pregnant women. *J.Endocrinol.* 1990; 127: 363-367.
- Westergaard LG, Andersen CY: Epidermal growth factor (EGF) in human preovulatory follicles. *Hum.Reprod.* 1989; 4: 257-260.
- Yamamoto S, Konishi I, Nanbu K, et al: Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor (bFGF) during folliculogenesis in the human ovary. *Gynecol.Endocrinol.* 1997; 11: 223-230.
- Yap OW, Chandrasekher YA, Giudice LC: Growth factor regulation of insulin-like growth factor binding protein secretion by cultured human granulosa-luteal cells. *Fertil Steril* 1998; 70: 535-540.
- Young RM, Mendoza AE, Collins T, Orkin SH: Alternatively spliced platelet-derived growth factor A-chain transcripts are not tumor specific but encode normal cellular proteins. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 6051-6054.
- Zheng J, Redmer DA, Reynolds LP: Vascular development and heparin-binding growth factors in the bovine corpus luteum at several stages of the estrous cycle. *Biol Reprod* 1993; 49: 1177-1189.

Lebenslauf

Name:		Astrid Heiser
Geburtsdatum/-ort		08.04.1972 / Jena
Schulbildung	1979 -1989	Allgemeinbildende Oberschule „Otto Grotewohl“ Jena
	1989 -1991	Erweiterte Oberschule „Johannes R. Becher“ Jena
	9/1991 - 8/1992	Staatliche Medizinische Fachschule Jena, Beginn einer Ausbildung in der Fachrichtung Logopädie
Studium	10/1992 - 4/1999	Studium der Humanmedizin an der Friedrich – Schiller - Universität Jena
Beruf	12/1999 - 11/00	AIP im Fach Neurologie im Städt. KH Martha Maria Halle - Dölau GmbH
	Seit 12/1999	Ärztin im Fach Anästhesie,- Intensiv- und Notfallmedizin im Berufsgenossenschaftlichen Klinikum Bergmannstrost
	Seit 6/2006	Fachärztin für Anästhesiologie

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. Hoppe, PD OA Dr. Starker (Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Friedrich-Schiller-Universität Jena)

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Halle, den 8.10.2006